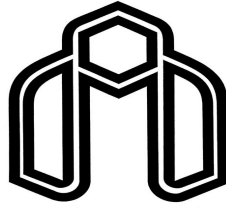


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی فعالیت کینتیکي آنزيم آميلوپولولاناز از باکتری بومي

Cohnella sp. A01

نگارنده: فائزه حسنی

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر سعید امین زاده

استاد مشاور

دکتر مجتبی ممرآبادی

شهریور ۱۳۹۵

شماره: ۲۶۴
تاریخ: ۱۳۹۵/۷/۱۸
ویرایش:



مدیریت تحصیلات تکمیلی
فرم شماره (۶)

بسمه تعالی

فرم صورت جلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) نتیجه ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فائزه حسنی به شماره دانشجویی ۹۲۱۶۸۰۴ رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی
✓ تحت عنوان بررسی فعالیت کینتیک آنزیم آمیلوپلولاناز از باکتری بومی *Cohnella* sp. A01
که در تاریخ ۱۳۹۵/۰۶/۱۸ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: عالی) - امتیاز: ۲۰ - / دفاع مجدد / مردود

۱- عالی (۲۰ - ۱۹)

۲- بسیار خوب (۱۸/۹۹ - ۱۸)

۳- خوب (۱۶ - ۱۷/۹۹)

۴- قابل قبول (۱۴ - ۱۵/۹۹)

۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استادیار	دکتر ناصر فرخی	استادیار	
۲- استادیار	دکتر سعید امین زاده	دانشیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر پرویز حیدری	استادیار	
۴- استاد ممتحن	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	
۵- استاد ممتحن	دکتر مهدیه پارسائیان	استادیار	

۱۵ ✓
۱۵ ✓
۱۵ ✓
✓
✓
✓

رئیس دانشکده:

تقدیر و شکر

پاس و ستایش مرخای راجل و جلالت که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، در نشان. آفریدگاری که خویش را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

از استاید گرامی و کراتقدرم جناب آقای دکتر ناصر فرخی و جناب آقای دکتر سعید امین زاده بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنمایی ایشان تا این پایان نامه غیر ممکن بود. از جناب آقای دکتر مجتبی ممرآبادی، که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند کمال شکر را می نمایم.

از برادر و خواهر عزیز و مهربانم که در طی این مدت با سنگینی تمام از ابراز محبت و همکاری دریغ ننموده اند، از دوستان عزیز و دلسوزم خانم هایمانه بنائیان، بیترا شیبی، زهرا کریمی، زهره جواهری، سیامیری، رایان ساقیان، شیامحمدی، نرگس عوض زاده، زینب تقوی، محبوبه...، سحر حیدرزاده، آزاده قاسمی، سحر قاسمی، حمیه... و آقای حسین طراحی مفرد که در طی این مدت از راهنمایی ها و کمک هایشان کمال استفاده را بردم، از دو دوست همراه و مهربانم مهدیه تلاوتی و مریم کر مرودی که در طی این مدت همراه من بودند کمال شکر را دارم. همچنین از تمامی دوستان، استاید، کارشناسان آزمایشگاه در دانشگاه صنعتی شاهرود و پژوهشگاه ژنمیک ملی و زیست فناوری به خاطر همه خوبی هایشان کمال شکر را دارم.

و در نهایت این رساله را به پدر و مادر عزیزم دو فرشته زینبی تقدیم می کنم به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان به پاس حافظه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگار ان بهترین پشتیبان است به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تعهد نامه

اینجانب **فائزه حسنی**، دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه **بررسی خصوصیات آنزیم آمیلوپلولاناز از باکتری بومی *Cohnella sp. A01* تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر سعید امینزاده، متعهد می شوم:**

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « University of Shahrood » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

چکیده

آمیلوپلواناز (EC. 3.2.1.41/1) از آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته و پلوان می‌باشد که قادر به شکستن پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 6) در نشاسته می‌باشد. در این پژوهش، ژن آمیلوپلواناز Amy1136 به طول ۲۱۶۶ جفت باز از باکتری گرمادوست *Cohnella* sp. A01 در حامل بیانی pET-26b(+) همسانه سازی و در باکتری *E. coli* BL21 بیان شد. آنزیم با روش شوک حرارتی، در دمای ۹۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه خالص گردید. بیان هترولوگ Amy1136 با روش سطح پاسخ بهینه شد، شرایط بهینه برای بیان آنزیم دمای ۲۶/۷ °C، دور چرخش ۱۷۹ rpm و جمعیت باکتری ۱/۲۵ بود. خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی آنزیم بر روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که آنزیم Amy1136 در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بهترین فعالیت را دارد. آنزیم همچنین نسبت به دمای بالا (۹۰ °C) و تغییرات pH پایدار بود. در بین یون‌های فلزی، Ag^+ موجب افزایش چند برابری فعالیت آنزیم شد، اما Co^{2+} فعالیت آمیلازی آنزیم را به صفر رساند، همچنین آنزیم غیروابسته به یون Ca^{2+} می‌باشد. پارامترهای کینتیکی K_m ، V_{max} ، k_{cat} و k_{cat}/K_m برای فعالیت آمیلازی به ترتیب $4/2 \text{ mg ml}^{-1}$ ، $650/38 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ، $1129/38 \text{ s}^{-1}$ ، $269/09$ و برای فعالیت پلوانازی به ترتیب $1/73 \text{ mg ml}^{-1}$ ، $337/59 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ، $586/1 \text{ s}^{-1}$ و $338/78 \text{ } \text{mg ml}^{-1}$ می‌باشد. پایداری Amy1136 در شرایط سخت، مانند دمای بالا، pHهای اسیدی و قلیایی، سورفکتانت، حلال‌های آلی و همچنین غیروابسته بودن به کلسیم، نشان می‌دهد که این آنزیم می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربردهای صنعتی به ویژه صنعت قندسازی نشاسته و شست‌وشو باشد.

کلمات کلیدی: آمیلوپلواناز، همسانه‌سازی، غیروابسته به کلسیم، *Cohnella* sp. A01

مقایسه آمیلوپیلولاناز بومی مقاوم به حرارت با آنزیم‌های مشابه

فائزه حسنی، سعیدامین زاده، ناصر فرخی، مجتبی ممرآبادی

اولین همایش بین‌المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران - دانشگاه شهید بهشتی - ۳ تا ۵ خرداد

۱۳۹۴

پذیرش مقاله به صورت پوستر

تعیین خصوصیات آمیلوپیلولاناز نو ترکیب مقاوم به حرارت و غیر وابسته به Ca^{2+} از باکتری بومی *Cohnella*
sp.A01

فائزه حسنی، سعیدامین زاده، ناصر فرخی، مجتبی ممرآبادی

دومین همایش بین‌المللی و چهاردهمین همایش ملی ژنتیک جمهوری اسلامی ایران - دانشگاه شهید بهشتی - ۱ تا ۳ خرداد

۱۳۹۵ پذیرش مقاله به صورت سخنرانی

فهرست مطالب

۱.....	فصل اول
۲.....	مقدمه و کلیات
۳.....	۱-۱ نشاسته
۴.....	۲-۱ هیدرولیز نشاسته
۵.....	۳-۱ آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته
۶.....	۴-۱ آنزیمهای شاخه‌شکن
۶.....	۵-۱ پلوان
۱۰.....	۶-۱ آنزیمهای تجزیه کننده پلوان
۱۰.....	۷-۱ پلوانازها
۱۳.....	۸-۱ پلوانازهای تیپ II (آمیلوپلوانازها)
۱۴.....	۹-۱ مکانسیم عمل پلوانازهای تیپ II
۱۵.....	۱۰-۱ کاربرد آمیلوپلوانازها
۱۵.....	۱-۱۰-۱ صنعت قندسازی و محلول سازی نشاسته
۱۸.....	۳-۱۰-۱ صنعت پخت نان
۱۸.....	۴-۱۰-۱ تولید شاخه‌های سیکلودکسترین
۱۹.....	۵-۱۰-۱ تولید سوخته‌های زیستی
۱۹.....	۶-۱۰-۱ کاربرد در صنعت کشاورزی و ارزش اقتصادی پلوانازها
۲۱.....	۱۱-۱ منابع تولید آنزیمهای پلواناز
۲۲.....	۱۳-۱ طراحی آزمایش به منظور انجام بهینه‌سازی
۲۳.....	۲-۱۳-۱ غربالگری
۲۴.....	۳-۱۳-۱ بهینه سازی

۲۶.....	۱۴-۱ هدف از پژوهش
۲۹.....	فصل دوم
۲۹.....	مرور ی بر منابع
۳۷.....	فصل سوم
۳۷.....	مواد و روشها
۳۸.....	۳-۱ مواد
۳۹.....	۲-۳ بررسیهای بیوانفورماتیک
۴۰.....	۳-۳ روشها
۴۰.....	۳-۳-۱ کشت باکتری <i>Cohnella</i> sp.A01 و استخراج DNA ژنومی
۴۰.....	۳-۳-۲ تکثیر ژن <i>Amy1136</i> با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
۴۱.....	۳-۳-۳ استخراج حامل بیانی pET-26b(+)
۴۱.....	۳-۳-۴ هضم محصول PCR و ناقل
۴۲.....	۳-۳-۵ الحاق محصول PCR در حامل بیانی
۴۲.....	۳-۳-۶ تهیه سلولهای مستعد باکتری <i>E. coli</i> BL21 و <i>E. coli</i> DH5α
۴۳.....	۳-۳-۷ انتقال محصول الحاق به میزبان تکثیری
۴۳.....	۳-۳-۸ استخراج پلاسمید از کلنیها به روش دستی (لیز قلیایی)
۴۴.....	۳-۳-۹ تعیین توالی ژن <i>Amy1136</i>
۴۴.....	۳-۳-۱۰ انتقال سازه pET-26b(+)- <i>Amy1136</i> به میزبان بیانی
۴۵.....	۳-۳-۱۱ بیان <i>Amy1136</i>
۴۵.....	۳-۳-۱۲ الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید- سدیم دو دسیل سولفات
۴۶.....	۳-۳-۱۳ لیز باکتریها با دستگاه اولتراسونیک
۴۷.....	۳-۳-۱۴ خالص سازی به روش شوک حرارتی
۴۷.....	۳-۳-۱۵ تعویض بافر آنزیم <i>Amy1136</i>

۴۸.....	۳-۳-۱۶ سنجش فعالیت آنزیم
۴۸.....	۳-۳-۱۷ سنجش فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی
۴۹.....	۳-۳-۱۸ طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی تولید و فعالیت Amy1136
۴۹.....	۳-۳-۱۸-۱ غربالگری فاکتورها توسط روش پلاکت برمن
۴۹.....	۳-۳-۱۸-۲ بهینه سازی بر اساس طراحی آزمایش به روش آر اس ام
۵۰.....	۱۹-۳-۳ بررسی خصوصیات بیوشیمیایی Amy1136
۵۰.....	۳-۳-۱۹-۱ بررسی اثر دما در فعالیت آنزیم
۵۰.....	۳-۳-۱۹-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما
۵۱.....	۳-۳-۱۹-۳ بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم Amy1136
۵۱.....	۳-۳-۱۹-۴ بررسی تاثیر pH بر پایداری آنزیم Amy1136
۵۲.....	۳-۳-۱۹-۵ بررسی تاثیر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم Amy1136
۵۲.....	۳-۳-۱۹-۶ بررسی تاثیر حلالهای آلی بر فعالیت آنزیم Amy1136
۵۳.....	۳-۳-۱۹-۷ بررسی تاثیر دترجنتها بر فعالیت آنزیم Amy1136
۵۳.....	۳-۳-۱۹-۸ بررسی تاثیر برخی مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم Amy1136
۵۳.....	۳-۳-۲۰ بررسی ارتباط غلظت سوبسترا با سرعت فعالیت آنزیم Amy1136
۵۵.....	فصل چهارم
۵۵.....	نتایج
۵۶.....	۱-۴ مطالعات بیوانفورماتیک
۵۶.....	۱-۱-۴ پیشگویی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم Amy1136
۵۶.....	۲-۱-۴ رسم درختچه فیلوژنتیک
۵۶.....	۲-۴ همسانه سازی ژن Amy1136 در ناقل بیانی pET-26b(-)
۵۸.....	۳-۴ بیان ژن Amy1136 در میزبان بیانی E. coli BL21
۵۸.....	۴-۴ سنجش فعالیت آنزیم Amy1136

۶۰	۵-۴ بهینه سازی تولید و فعالیت آنزیم Amy1136
۶۰	۱-۵-۴ تعیین فاکتورهای موثر بر تولید و فعالیت آنزیم Amy1136
۶۲	شکل ۴-۶: نمودار پارتو خروجی برنامه Plackett-Burman به
۶۳	۲-۵-۴ بهینه سازی با طراحی آزمایش به روش RSM
۶۳	۱-۲-۵-۴ تجزیه آماری
۶۶	۲-۲-۵-۴ تجزیه و تحلیل فرآیند بهینه سازی
۷۰	۳-۲-۵-۴ بهینه سازی عاملهای فرآیند
۷۰	۶-۴ بررسی تاثیر دما بر فعالیت Amy1136
۷۰	۷-۴ بررسی تاثیر دما بر پایداری آنزیم Amy1136
۷۳	۸-۴ بررسی تاثیر pH بر فعالیت Amy1136
۷۳	۹-۴ بررسی تاثیر pH بر پایداری Amy1136
۷۶	۱۰-۴ بررسی تاثیر یونهای فلزی بر فعالیت Amy1136
۷۶	۱۱-۴ بررسی تاثیر حلالهای آلی بر فعالیت Amy1136
۷۸	۱۲-۴ بررسی تاثیر دترجنتها بر فعالیت Amy1136
۷۸	۱۳-۴ بررسی تاثیر برخی مواد شیمیایی بر فعالیت Amy1136
۸۰	۱۴-۴ تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم Amy1136
۸۳	فصل پنجم
۸۳	بحث و پیشنهادات
۹۵	پیشنهادات
۹۷	منابع
۹۸	منابع

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱: (a) بخشی از آمیلوز، واحدهای تکرار شده گلوکز با پیوند α - $(1 \rightarrow 4)$ نشان داده شده است، (b) بخشی از مولکول آمیلوپکتین، پیوندهای α - $(1 \rightarrow 4)$ و α - $(1 \rightarrow 6)$ نشان داده شده است، (c) بخشی از مولکول گلیکوژن، پیوندهای α - $(1 \rightarrow 4)$ و α - $(1 \rightarrow 6)$ نشان داده شده است و تفاوت آن با آمیلوپکتین در تعداد شاخهها میباشد که در گلیکوژن تعداد شاخهها بیشتر میباشد (Hii et al., 2012) با تغییر. ۴
- شکل ۱-۲: شکل شماتیک عمل آنزیمهای درگیر در کاتابولیسم نشاسته، دایرههای سیاه قندهای احیا را نشان میدهد، همانطور که در شکل مشاهده میشود اندوآمیلازها، اگزوآمیلازها، آنزیمهای شاخهشکن که خود به چند گروه پلوان هیدرولاز I، II و III، پلواناز I، پلواناز II و ایزوآمیلاز تقسیم میشوند و گلیکوزیل ترنسفرازها آنزیمهای درگیر در کاتابولیسم نشاسته میباشد، که هر کدام بر روی پیوند خاصی اثر گذاشته و محصولات متفاوتی ایجاد میکنند (Hii et al., 2012). ۷
- شکل ۱-۳: ساختار شماتیک پلوان، (a) تکرار واحدهای مالتوتریوز با پیوند α - $(1 \rightarrow 6)$ ، (b) تکرار واحدهای پانوز با پیوند α - $(1 \rightarrow 4)$ (Singh et al., 2008). ۹
- شکل ۱-۴: آنزیمهای تجزیه کننده پلوان، آنزیمهای تجزیه کننده پلوان بر اساس اختصاصی بودن سوبسترا و محصول نهایی به ۵ گروه اصلی تقسیم میشوند: پلوان هیدرولاز تیپ I (نئوپلواناز، EC 3.2.1.135): پیوندهای α - $(1 \rightarrow 4)$ را هیدرولیز میکند و محصول آن پانوز است. پلوان هیدرولیز تیپ II (ایزوپلواناز، EC 3.2.1.57): تولید ایزوپانوز از پلوان را بر عهده دارد. پلوان هیدرولاز تیپ III: پیوندهای α - $(1 \rightarrow 6)$ و α - $(1 \rightarrow 4)$ را هیدرولیز میکند و از پلوان، مالتوتریوز، پانوز و مالتوز تولید میکند. پلواناز تیپ I (EC 3.2.1.41): به طور اختصاصی پیوندهای α - $(1 \rightarrow 6)$ را هیدرولیز میکند و محصول آن مالتوتریوز میباشد. پلواناز تیپ II (آمیلولپلواناز): هم پیوندهای α - $(1 \rightarrow 6)$ و هم α - $(1 \rightarrow 4)$ را هیدرولیز میکند (Doman-Pytka & Bardowski, 2004). ۱۱
- شکل ۱-۵: شکل شماتیک عمل پلوانازهای I و II، همانطور که مشاهده میشود پلواناز I پیوند در پلوان و اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای را هیدرولیز کرده و مالتوتریوز و اولیگوساکاریدهای خطی آزاد میکند، اما پلواناز II پیوند در پلوان و پیوندهای α - $(1 \rightarrow 4)$ و α - $(1 \rightarrow 6)$ را در اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای هیدرولیز کرده که از هیدروایز پلوان مالتوتریوز و از هیدرولیز اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای مالتوز، مالتوتریوز و مالتوتراز آزاد میکند (Nisha & Satyanarayana, 2016). ۱۲
- شکل ۱-۶: مکانیسم عمل پلوانازها، (a) اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتئین دهنده Asp، پروتونه میشود. (b) مولکول آب وارد و توسط اسیدآمین Glu فعال میگردد. (c) مولکول آب پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱- را هیدرولیز میکند (Hasan et al., 2006). ۱۵
- شکل ۱-۹: شکل شماتیک فرآیند قندسازی و محلول سازی نشاسته به صورت معمول و ایده‌آل، در فرآیند معمولی نشاسته به وسیله آنزیمهای آمیلولیتیکهای مختلفی به محلول نشاسته و قندهای ساده‌تر و با ارزشتر مانند گلوکز، مالتوز و فروکتوز تبدیل میشود. فرآیند ایده‌آل تبدیل نشاسته به محصولات ساده‌تر و نهایی با استفاده از یک آنزیم مقاوم به حرارت و شرایط اسیدی و همچنین غیروابسته به یون Ca^{2+} انجام میگردد (Nisha & Satyanarayana, 2016). ۱۷

شکل ۱-۸: a) نمودار سطح پاسخ سه‌بعدی، به منظور توضیح رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ در قالب یک نمودار سه‌بعدی نشان داده می‌شود (b) رسم کانتوری سطح پاسخ، برای به تصویر کشیدن بهتر شکل سطح پاسخ، معمولاً کانتور سطح پاسخ ارائه می‌شود. در رسم کانتوری، خطوط پاسخ ثابت در صفحه X_1 و X_2 نمایش داده می‌شود و هر کانتور مربوط به ارتفاع مشخصی از سطح پاسخ است. ۲۷

شکل ۴-۱: رسم درختچه فیلوژنتیک به منظور بررسی روابط فیلوژنی آنزیم باکتری *Cohnella* sp. A01 با اعضای تولید کننده آنزیم آمیلوپولولاناز خانواده‌های GH13 و GH57 که تعیین خصوصیت شده‌اند، همانطور که در شکل مشاهده می‌شود آنزیم این تحقیق در گروه خانواده ۵۷ قرار گرفته می‌شود. درختچه فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار Mega6.06 با بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد (*C. sp* F32) یک آنزیم بتاگلوکاناز بوده و به عنوان یک عضو خارج گروه در رسم درختچه از آن استفاده گردید. ۵۷

شکل ۴-۲: همسانسازی ژن *Amy1136* در حامل بیانی (M pET-26b(+)) نشانگر وزن مولکولی DNA (۱) حامل pET-(+) 26 (۲) حامل نوترکیب *Amy1136*-pET-26b(+)-3 حامل نوترکیب *Amy1136*-pET-26b(+)-4 برش خورده با آنزیم *Nde* I (۴) برش آنزیمی حامل نوترکیب *Amy1136*-pET-26b(+)-5 با آنزیمهای *Nde* I و *Not* I و خروج ژن *Amy1136* (۵) محصول PCR ژن *Amy1136* در حامل نوترکیب *Amy1136*-pET-26b(+). ۵۹

شکل ۴-۳: الکتروفورز SDS-PAGE برای بررسی بیان ژن *Amy1136* (M) نشانگر وزن مولکولی پروتئین (۱) بیان قبل از القای IPTG (کنترل منفی) (۲) بیان آنزیم *Amy1136* پس از القای IPTG. ۶۱

شکل ۴-۴: الکتروفورز SDS-PAGE بعد از سونیکاسیون سلول باکتری *E. coli* BL21 و خالص سازی آنزیم *Amy1136* (M) نشانگر وزن مولکولی DNA (۱) محلول پروتئینی حاصل از سونیکاسیون (۲) *Amy1136* خالص شده. ۶۱

شکل ۴-۵: منحنی استاندارد مالتوز. ۶۱

شکل ۴-۶: نمودار پارتو خروجی برنامه **Plackett-Burman** به منظور یافتن فاکتورهای اثرگذار بر فرآیند تولید و فعالیت آنزیم *Amy1136*، همانطور که مشاهده می‌شود ۳ فاکتور جمعیت باکتری، دما و دور چرخش فاکتورهای تاثیرگذار شناخته شدند. ۶۲

شکل ۴-۷: نمودار توزیع نرمال داده‌ها. این نمودار نمایانگر توزیع یکنواخت نتایج آزمایش انجام شده است و بیانگر این است که خطاهای احتمالی تاثیری بر نتیجه نهایی ندارد. ۶۸

شکل ۴-۸: نمودار مقایسه مقادیر حقیقی و پیش‌بینی شده برای میزان فعالیت آنزیم *Amy1136*، بر اساس این مدل میتوان گفت: نتایج حاصل از آزمایش با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم افزار مطابقت داشته و در محدوده تعریف شده توسط نرم افزار میباشد. ۶۸

شکل ۴-۹: نمودار سطح پاسخ اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت آنزیم *Amy1136*، تاثیر متقابل دما و دور چرخش بر میزان فعالیت کاملاً مشخص است؛ به طوری که بیشترین میزان تجزیه در دمای و دور چرخش میانه میباشد. ۶۹

شکل ۴-۱۰: نمودار کانتور اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت آنزیم *Amy1136*، در این نمودار محور افقی و عمودی، فاکتورهای تاثیرگذار و رنگ نمودار میزان فعالیت آنزیم است که رنگهای متمایل به قرمز میزان فعالیت بالاتر را نشان میدهد. ۶۹

شکل ۴-۱۱: نمودار سطح پاسخ اثر تغییر فاکتورهای دما و جمعیت باکتری بر میزان فعالیت *Amy1136*. همانطور که مشخص است بیشترین میزان تجزیه در دمای و جمعیت باکتری میانه میباشد. ۷۱

شکل ۴-۱۲: نمودار کانتور اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت *Amy1136*. همانطور که مشخص است بیشترین میزان تجزیه در دمای و جمعیت باکتری میانه میباشد. ۷۱

شکل ۴-۱۳: تعیین دمای مناسب بر فعالیت Amy1136، در دمای ۹۰-۱۰ درجه سانتی گراد در حضور دو سوبسترای نشاسته (Starch) و پلولان (Pullulan) و pH = ۸ با ۳ بار تکرار اندازه‌گیری شد. ۷۲

شکل ۴-۱۴: پایداری دمایی Amy1136 در دماهای مختلف، فعالیت Amy1136 بعد از قرار گرفتن آنزیم در دماهای ۹۰-۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت، در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ در حضور سوبسترای نشاسته و پلولان با ۳ بار تکرار اندازه‌گیری شد. ۷۲

شکل ۴-۱۵: پایداری Amy1136 در دما در زمانهای مختلف، آنزیم Amy1136 در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. فعالیت آنزیم تا ۴ ساعت در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ در حضور سوبسترا نشاسته اندازه‌گیری شد. ۷۴

شکل ۴-۱۶: تعیین pH مناسب فعالیت Amy1136، در pH ۴-۱۱ در حضور دو سوبسترای نشاسته و پلولان (۵۰ °C و ۳ تکرار) اندازه‌گیری شد. ۷۴

شکل ۴-۱۷: پایداری Amy1136 به مدت ۲ ساعت در pH های ۳ تا ۱۰، فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ با سه بار تکرار اندازه‌گیری گردید. ۷۵

شکل ۴-۱۸: پایداری Amy1136 در pH در زمانهای مختلف، Amy1136 در pH های ۴، ۸ و ۱۱ قرار داده شد. فعالیت آنزیم تا ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ در حضور نشاسته اندازه‌گیری شد. ۷۵

شکل ۴-۱۹: اثر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای ۳ و ۶ میلی مولار یونهای فلزی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سوبسترا نشاسته اندازه‌گیری شد (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد). ۷۷

شکل ۴-۲۰: اثر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای ۳ و ۶ میلی مولار یونهای فلزی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سوبسترا پلولان اندازه‌گیری شد (کنترل صفر در نظر گرفته شد). ۷۷

شکل ۴-۲۱: اثر حلالهای آلی بر فعالیت Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای ۱ و ۲ درصد حلالهای آلی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سوبسترای نشاسته و پلولان (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد). ۷۹

شکل ۴-۲۲: اثر دترجنتها بر فعالیت Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای ۱ و ۲ درصد دترجنتها در دمای ۵۰ °C و pH = بر روی سوبسترا نشاسته و پلولان (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد). ۷۹

شکل ۴-۲۳: اثر مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۱ میلی مواد شیمیایی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سوبسترا نشاسته و پلولان اندازه‌گیری شد (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد). ۸۰

شکل ۳-۲۴: نمودار میکائیلیس منتن ۸۱

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۳: محدوده تغییرات فاکتورها در طراحی ۵۰
- جدول ۲-۳: محدوده تغییرات فاکتورها در طراحی سطح پاسخ به روش طرح مرکب مرکزی ۵۱
- جدول ۱-۴: نتایج آزمایش‌های طراحی شده توسط برنامه Plackett-Burman ۶۲
- جدول ۲-۴: نتایج آنالیز واریانس خروجی برنامه Plackett-Burman ۶۳
- جدول ۳-۴: نتایج آزمایش‌های طراحی شده به روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی ۶۴
- جدول ۴-۴: تحلیل واریانس داده‌ها برای پاسخ میزان بیان و فعالیت Amy1136 به روش سطح پاسخ ۶۵
- جدول ۵-۴: مقادیر ضرایب تبیین برای میزان بیان و فعالیت آنزیم Amy1136 به روش سطح پاسخ ۶۶
- جدول ۶-۴: اثر فاکتورها بر میزان بیان و فعالیت آنزیم Amy1136 به روش سطح پاسخ ۶۷
- جدول ۷-۴: تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم Amy1136 ۸۱

فصل اول

مقدمه و کلیات

با توجه به کاربرد وسیع محصولات حاصل از هیدرولیز نشاسته در صنایع مختلف، از جمله صنایع غذایی و دارویی و با افزایش روز افزون مصرف مواد قندی در دنیا و بالا بودن هزینه تولید شکر، توجه خاصی به تولید شربت‌های قندی از نشاسته معطوف شده است. نشاسته (پلیمر گلوکز) از دو پلی-ساکارید، آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل شده است. معمولاً ۷۰-۸۵٪ ترکیب نشاسته را آمیلوپکتین تشکیل می‌دهد (Gerday, 2000). هیدرولیز نشاسته به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته یعنی آمیلاز و پلولاناز انجام می‌گیرد. محصولات هیدرولیز نشاسته قندهای احیایی گلوکز و اولیگومرهای آن می‌باشد. ضرورت استفاده از آنزیم‌ها بازده پایین هیدرولیز اسیدی است. هیدرولیز آنزیمی باعث تبدیل نشاسته به مولکول‌هایی مثل گلوکز، الیگوساکاریدها و دکستین می‌شود (Yang et al., 2013). در دهه ۱۹۶۰ برای نخستین بار از آنزیم گلوکوآمیلاز^۱ که قادر به هیدرولیز نشاسته به گلوکز بود، استفاده شد. بعد از آن به مرور از سایر آنزیم‌های شاخه‌کن برای هیدرولیز نشاسته در صنعت استفاده شد. در حال حاضر پلولانازها^۲، ایزوآمیلازها^۳ و گلوکان‌هیدرولازها^۴ آنزیم‌های شاخه-شکن مورد استفاده در صنعت می‌باشند. پلولاناز یکی از اعضای خانواده ۱۳ و ۵۷ گلیکوزیل‌هیدرولازها می‌باشد که به‌طور ویژه به نقاط شاخه‌ای در پلولان، نشاسته و دکستین‌ها حمله می‌کند. پلولانازها به دو نوع پلولاناز تیپ I و پلولاناز تیپ II (آمیلوپلولانازها) تقسیم می‌شوند. این آنزیم تاکنون از منابع بسیاری تشخیص و جداسازی شده است. در تحقیق حاضر از باکتری گرمادوست *Cohnella* sp. A01 برای استخراج ژن پلولاناز استفاده گردید. در فصل اول کلیاتی مربوط به ساختار، خصوصیات نشاسته و پلولان و آنزیم‌های موثر بر هیدرولیز آن‌ها، خصوصیات آنزیم پلولاناز، انواع آن، نحوه عمل، ساختار و همچنین کاربردهای آن صحبت خواهد شد.

1. Glucoamylase
2. Pullulanase
3. Isoamylase
4. Glucanhydrolase

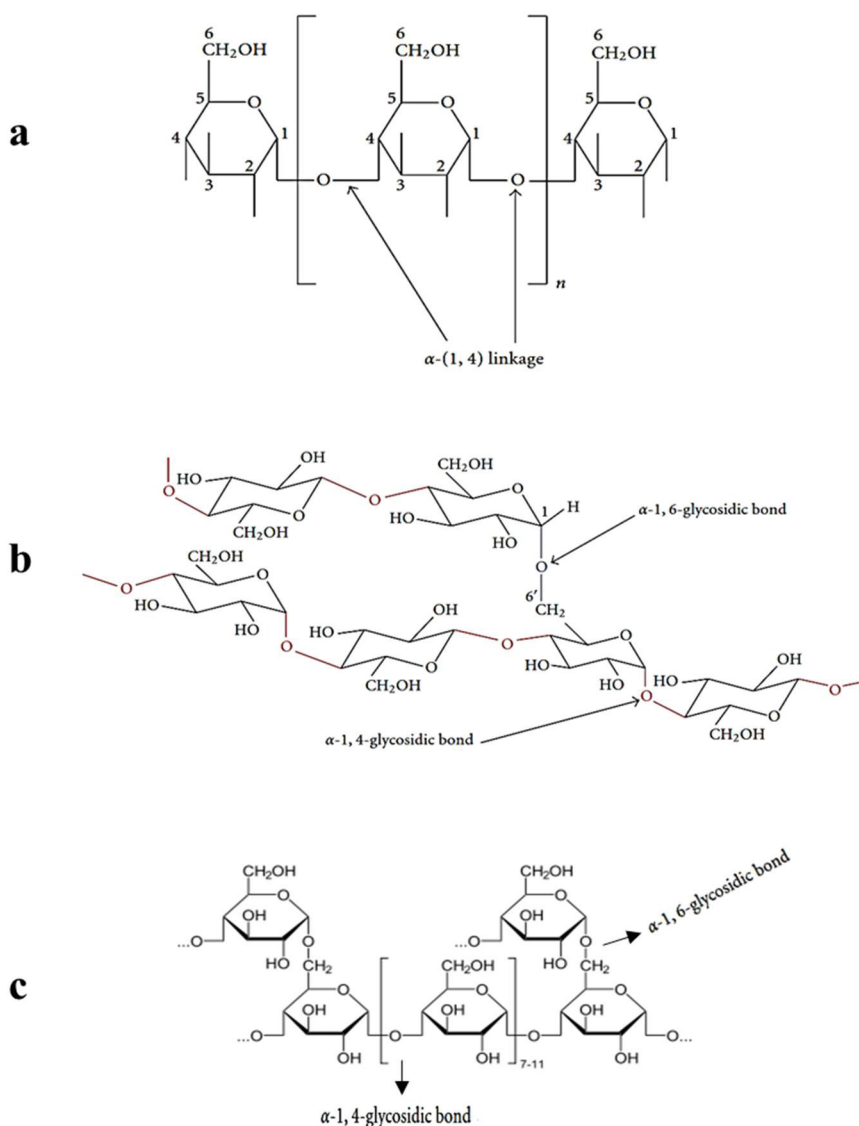
۱-۱ نشاسته

نشاسته کربوهیدرات ذخیره‌ای در گیاهان و منبع اصلی انرژی برای موجودات فاقد توانایی فتوسنتز است که به صورت گرانول در آب نامحلول می‌باشد. بیشترین منابع تولید نشاسته، سیب‌زمینی، ذرت، گندم، چاودار، سورگوم، برنج، جو، نخود و تاپیوکا می‌باشد (Nisha & Satyanarayana, 2016). نشاسته بیوپلیمری متشکل از واحدهای α -D گلوکز است که به وسیله مولکول اکسیژن کربن شماره یک با پیوند گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. پیوندهای گلیکوزیدی نسبت به شرایط قلیایی پایدار هستند درحالی‌که تیمار نشاسته با اسیدها و آنزیم‌های مخصوص به واحدهای گلوکز شکسته می‌شوند. اکثر نشاسته‌ها مخلوطی از دو پلی‌ساکارید متمایز آمیلوز و آمیلوپکتین هستند. آمیلوز پلیمری خطی با وزن مولکولی بالا، محلول در آب است که در آن واحدهای گلوکز با پیوند α -(1 \rightarrow 4) به هم متصل شده‌اند (شکل ۱-a) و آمیلوپکتین پلیمر شاخه‌ای بلندتر، نامحلول در آب، متشکل از پیوندهای α -(1 \rightarrow 6) است (شکل ۱-b). نشاسته‌ها نسبت‌های متفاوتی از آمیلوز و آمیلوپکتین دارند که تفاوت زیادی در خصوصیات فیزیکی آن‌ها وجود دارد. اصولاً ۷۰-۸۰٪ ترکیب نشاسته را آمیلوپکتین تشکیل می‌دهد. گلیکوژن و آمیلوپکتین ساختار مشابه به هم دارند با این تفاوت که در گلیکوژن، در هر ۱۰ پیوند α -(1 \rightarrow 4) یک شاخه قرار دارد (شکل ۱-c)، در حالی‌که در آمیلوپکتین در هر ۳۰ پیوند α -(1 \rightarrow 4) یک شاخه وجود دارد (Nakamura et al., 1996).

نشاسته در صنایع غذایی، دارویی، تهیه پلیمرها و سورفکتانت‌ها و نساجی کاربرد دارد. سوسپانسیون نشاسته بر اثر حرارت و جذب آب ژلاتینه می‌شود که این پدیده در پخت نان و نساجی مهم است. در اثر سرد شدن نشاسته ژلاتینه شده جز آمیلوزی کریستالی می‌شود و یا موجب بیات شدن سریع نان می‌شود.

۲-۱ هیدرولیز نشاسته

سرعت تجزیه نشاسته به درجه پلیمریزاسیون آن بستگی دارد و آمیلوز سریع تر از آمیلوپکتین تجزیه می شود. در هر حال، ترکیب مناسبی از آنزیم های آمیلوپکتیک نشاسته را به طور کامل به گلوکز دپلیمریزه می کند.



شکل ۱-۱: (a) بخشی از آمیلوز، واحدهای تکرار شده گلوکز با پیوند α -(1 \rightarrow 4) نشان داده شده است، (b) بخشی از مولکول آمیلوپکتین، پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 6) نشان داده شده است، (c) بخشی از مولکول گلیکوژن، پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 6) نشان داده شده است و تفاوت آن با آمیلوپکتین در تعداد شاخه ها می باشد که در گلیکوژن تعداد شاخه ها بیشتر می باشد (Hii et al., 2012) با تغییر.

هیدرولیز نشاسته به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم‌های آمیلاز انجام می‌گیرد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی نشاسته، محققان توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی نموده‌اند. محصولات هیدرولیز معمولاً قندهای احیای گلوکز و اولیگومرهای آن می‌باشند. هیدرولیز آنزیمی نشاسته باعث تبدیل نشاسته به مولکول‌هایی مثل گلوکز، اولیگوساکاریدها و دکسترین^۱ می‌شود. پایین بودن هزینه‌ها در هیدرولیز آنزیمی مزیت اصلی این فرآیند نسبت به روش‌های هیدرولیز اسیدی می‌باشد. هیدرولیز آنزیمی در شرایط ملایم یعنی $\text{pH} = 4/8$ و دمای $45-50$ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد، همچنین در آن خوردگی شیمیایی وجود ندارد (Kuddus, 2013).

امروزه در صنعت به دلیل تقاضای روز افزون برای تولید محصولاتی با ماده اولیه نشاسته، استفاده از آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته رو به افزایش است. صنعت فرآوری نشاسته، یکی از بخش‌های عمده در تجزیه پسماندها و تبدیل آن‌ها به محصولات مفید می‌باشد که در بسیاری از محصولات کشاورزی که شامل نشاسته هستند، مانند تنباکو، گندم که مستعد تولید گاز یا سوخت مایع به وسیله فرآوری میکروبی هستند، می‌باشد.

۱-۳ آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته

آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته عبارتند از آلفا آمیلاز، گلوکز آمیلاز، بتا آمیلاز، ایزو آمیلاز، پلواناز، آلفا گلوکزوبلاز و گلوکز آمیلاز این آنزیم‌ها را می‌توان به ۳ دسته، اندو آمیلازها^۲، اگزو آمیلازها^۳، آنزیم‌های شاخه‌شکن^۴، تقسیم بندی نمود (شکل ۱-۲). دسته سوم شامل ایزو آمیلازها و پلوانازها بوده و می‌توانند باندهای α -(۱→۶) را هیدرولیز کنند.

1. Dextrin
2. Endoamylase
3. Exoamylase
4. Debranching enzyme

۴-۱ آنزیم‌های شاخه‌شکن

آنزیم‌های شاخه‌شکن پیوندهای α -(۱→۶) را در آمیلوپکتین، گلیکوژن و پلیمرهای آزاد هیدرولیز می‌کنند. میل آنزیم‌های شاخه‌شکن به پیوندهای α -(۱→۶) آن‌ها را از دیگر آمیلازها که میل اولیه به پیوندهای α -(۱→۴) دارند، متمایز می‌کند. این آنزیم‌ها شامل ایزوآمیلازها (EC 3.2.1.68) و پولونازها (3.2.1.41) هستند. تفاوت پولوناز با ایزوآمیلاز در توانایی هیدرولیز پولان است. پولونازها و ایزوآمیلازها تنها پیوندهای جانبی α -(۱→۶) را هیدرولیز می‌کنند با این تفاوت که ایزوآمیلازها فقط زنجیره‌های جانبی با بیش از ۳ واحد گلوکز را هیدرولیز می‌کنند در حالیکه پولونازها بر روی زنجیره‌های جانبی کمتر از ۳ واحد هم عمل می‌کنند (Hii et al., 2012).

۵-۱ پولون

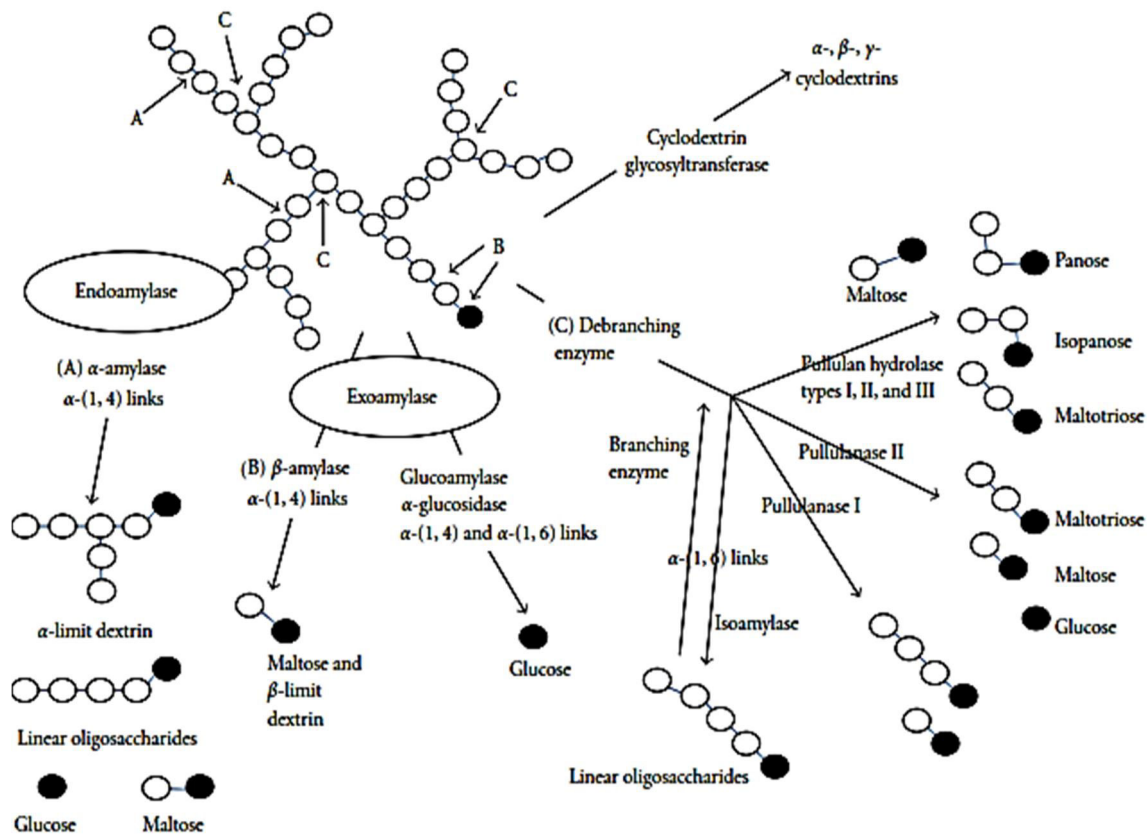
پولون پلیمر خطی و متشکل از واحدهای مالتوتریوز می‌باشد که به وسیله پیوندهای گلیکوزیدی α -(۱→۶) (شکل ۱-۳ a) و یا واحدهای پانوز^۱ است که به وسیله پیوندهای α -(۱→۴) متصل شده (Singh et al., 2008)، (شکل ۱-۳ b) و در صنایع مختلف به کار گرفته می‌شود. پیوندهای α -(۱→۶) در پولون مشابه این پیوندها در نقاط شاخه‌ای آمیلوپکتین می‌باشد، و در واقع پولان به طور گسترده به عنوان یک سوبسترای مدل برای آنزیم‌های شاخه‌شکن نشاسته مورد توجه قرار می‌گیرد (Plant et al., 1986).

پولون محلول در آب بوده و به شکل محلول ویسکوز و چسبناک در آمده، اما در حلال‌هایی مانند اتانول، متانول و استون نامحلول می‌باشد (Shingel, 2004).

پولون کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی (در ترکیب فرمولاسیون مواد غذایی کم کالری به کار می‌رود) و دارویی (در ساخت چسب دندان) دارد (Shingel 2004; Singh et al., 2008).

پولان پلی ساکارییدی است که توسط قارچ *Aureobasidium pullulanas* تولید می شود که از این

قارچ قبلا



شکل ۱-۲: شکل شماتیک عمل آنزیم های درگیر در کاتابولیسم نشاسته، دایره های سیاه قندهای احیا را نشان می دهد، همانطور که در شکل مشاهده می شود اندوآمیلازها، اگزوآمیلازها، آنزیم های شاخه شکن که خود به چند گروه پولان هیدرولاز I، II و III، پولاناز I، پولاناز II و ایزوآمیلاز تقسیم می شوند و گلیکوزیل ترنسفرازها آنزیم های درگیر در کاتابولیسم نشاسته می باشند، که هر کدام بر روی پیوند خاصی اثر گذاشته و محصولات متفاوتی ایجاد می کنند (Hii et al., 2012).

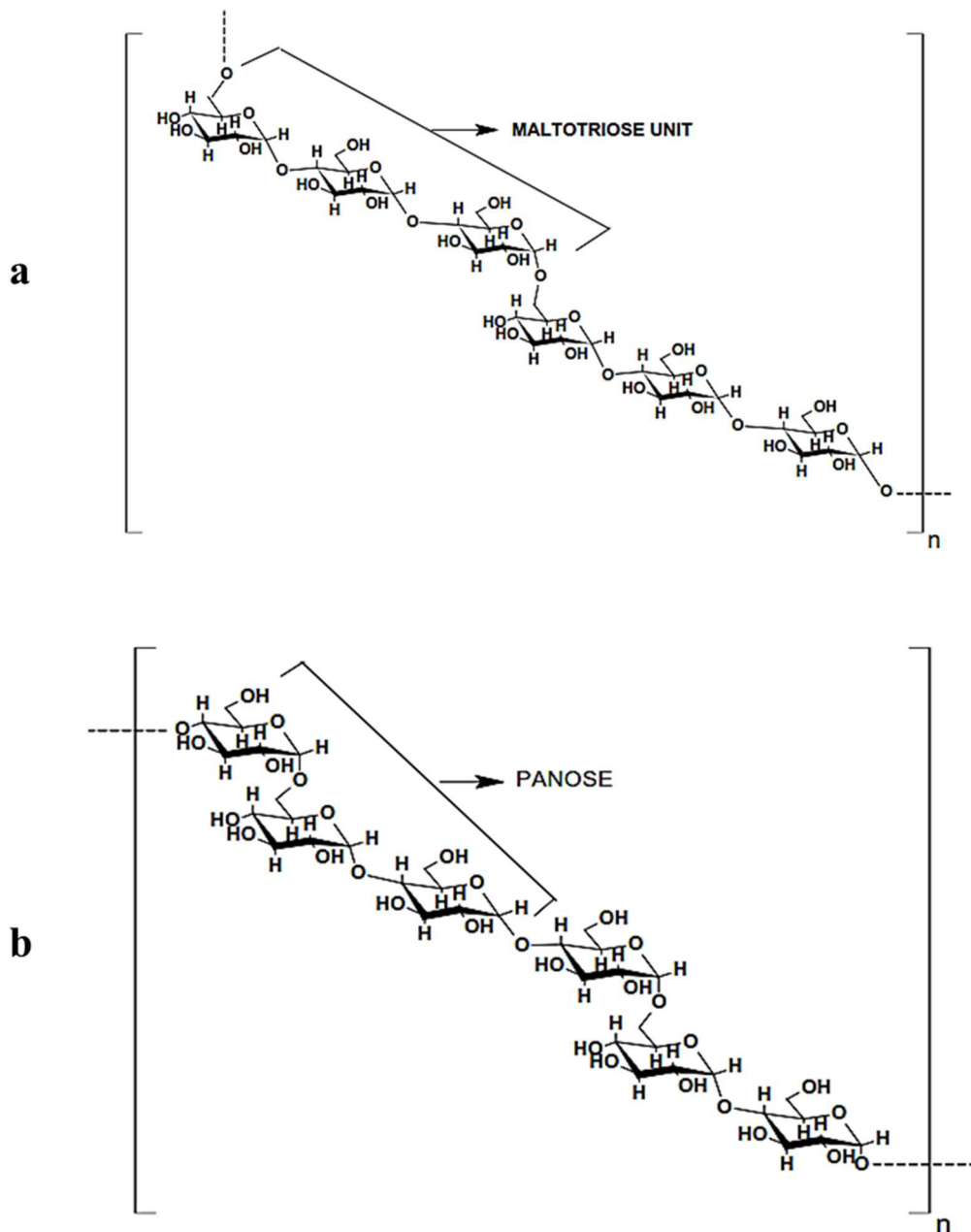
تحت نام‌های *Pematium pullulanas* و *Pullularis pullulanas* خوانده می‌شد. پلوان علاوه بر *A. pullulanas* توسط قارچ ساپروفیت *Tremella mesentrica* و قارچ انگل اجباری درخت‌ها به نام *Cyttaria harioti* و *Cyttaria darwini* و همچنین قارچ *Cryphonectaria parasitica* نیز تولید می‌شود که پلوان تولید شده در آخرین مورد ذکر شده دارای خاصیت فیتوتوکسیک است.

Aureobasidium pullulanas نخستین بار توسط دباری^۱ در سال ۱۸۶۶ توضیح داده شد. بائر^۲ در سال ۱۹۳۸ برای نخستین بار تولید پلی‌ساکارید را در این قارچ مشاهده کرد و برینر^۳ در سال ۱۹۵۸ پلیمر تولید شده را جداسازی کرد و به تعیین خصوصیات آن پرداخت. بندر^۴ و همکارانش در سال ۱۹۵۹ پلی‌ساکارید جدید را مطالعه کرده و آن را پلوان نامیدند. و در سال ۱۹۶۰ ساختار اساسی پلوان مشخص شد. بندر و والنفس^۵ در سال ۱۹۶۱ آنزیم پلواناز را کشف کردند که پیوندهای α -(۱→۴) را هیدرولیز می‌کند از این رو پلوان را به عنوان پلیمری متشکل از واحدهای متصل مالتوتریوز می‌شناسیم اما کاتلی^۶ و همکارانش وجود مقدار ناچیزی از مالتوتریوز را در پلوان نشان دادند. تولید تجاری پلوان در سال ۱۹۷۹ توسط شرکت هایاشیبارا^۷ آغاز شد (Steinbuchel et al., 2005). پلوان به عنوان یک ماده‌ی ذخیره‌ای تلقی نمی‌شود زیرا خود قارچ *Aureobasidium* قادر به هیدرولیز پلوان نیست و نمی‌تواند آن را به قندهای متابولیزه شونده هیدرولیز کند. عموماً چنین پنداشته می‌شود که پلوان و پلی‌ساکاریدهای مشابه جهت محافظت سلول‌ها از خشکیدگی به کار می‌روند. محققین نشان داده‌اند که این پلیمر به اتصال قارچ به سطح برگ‌ها و بلاستوسپور آن به سطح چربی‌های رنگ آمیزی شده کمک می‌کند (Steinbuchel et al., 2005).

1. Debary
2. Bauer
3. Beriner
4. Bender
5. Wallenfels
6. Catly
7. Hayashibara

پلوان به صورت داخل سلولی ساخته می‌شود و سپس به خارج سلول ترشح می‌شود. دانشمندان با

استفاده از



شکل ۱-۳: ساختار شماتیک پلوان، (a) تکرار واحدهای مالتوتریوز با پیوند α -(۱→۶)، (b) تکرار واحدهای پانوز با پیوند α -(۱→۴) (Singh et al., 2008)

عصاره عاری از قارچ *A. pullulanas* و UDPG و در حضور ATP توانسته‌اند پلوان را سنتز کنند (Steinbuechel et al., 2005).

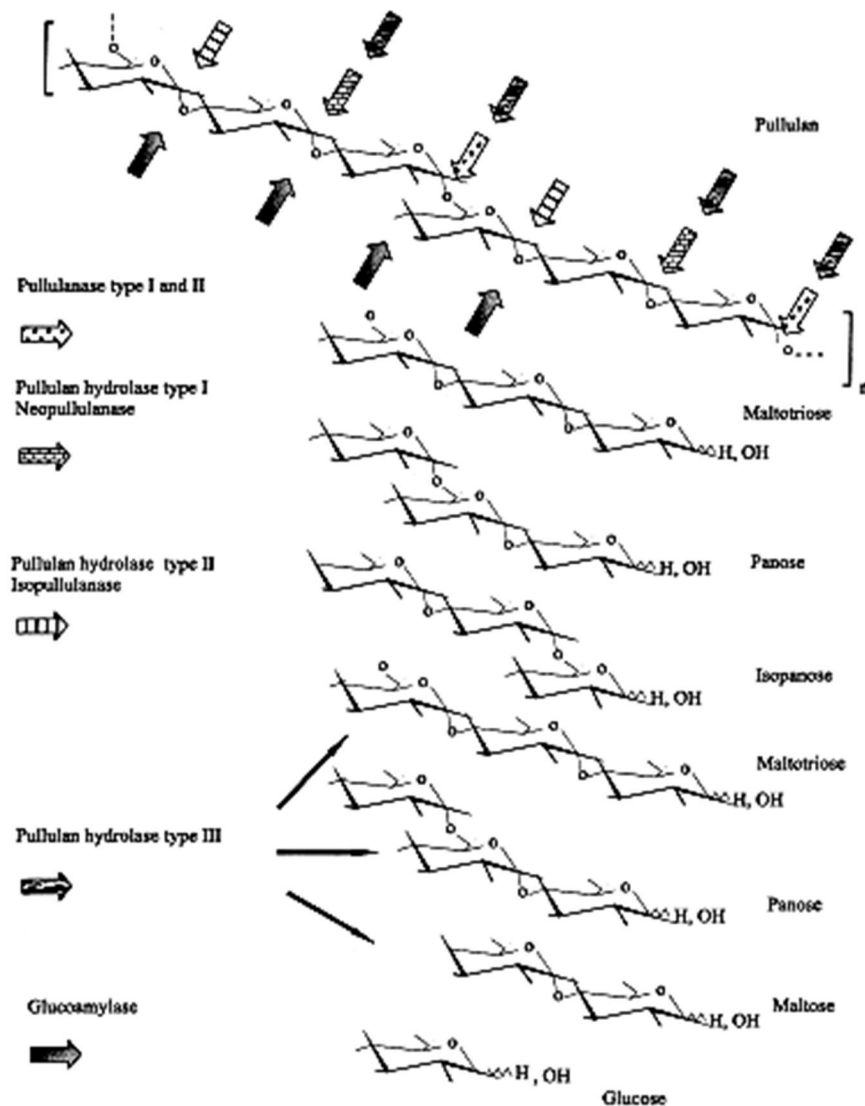
۱-۶ آنزیم‌های تجزیه کننده پلوان

آنزیم‌های تجزیه کننده پلوان بر اساس اختصاصی بودن سوبسترا و محصول نهایی به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند: پلوان هیدرولاز تیپ I (نئوپولولاناز، EC 3.2.1.135): پیوندهای α -(1→4) را هیدرولیز می‌کند و محصول آن پانوز است. پلوان هیدرولیز تیپ II (ایزوپولولاناز، EC 3.2.1.57): تولید ایزوپانوز از پلوان را بر عهده دارد. پلوان هیدرولاز تیپ III: پیوندهای α -(1→4) و α -(1→6) را هیدرولیز می‌کند و از پلوان، مالتوتریوز، پانوز و مالتوز تولید می‌کند. پلواناز تیپ I (EC 3.2.1.41): به طور اختصاصی پیوندهای α -(1→6) را هیدرولیز می‌کند و محصول آن مالتوتریوز می‌باشد. پلواناز تیپ II (آمیلوپولولاناز): هم پیوندهای α -(1→6) و هم α -(1→4) را هیدرولیز می‌کند (شکل ۱-۴).

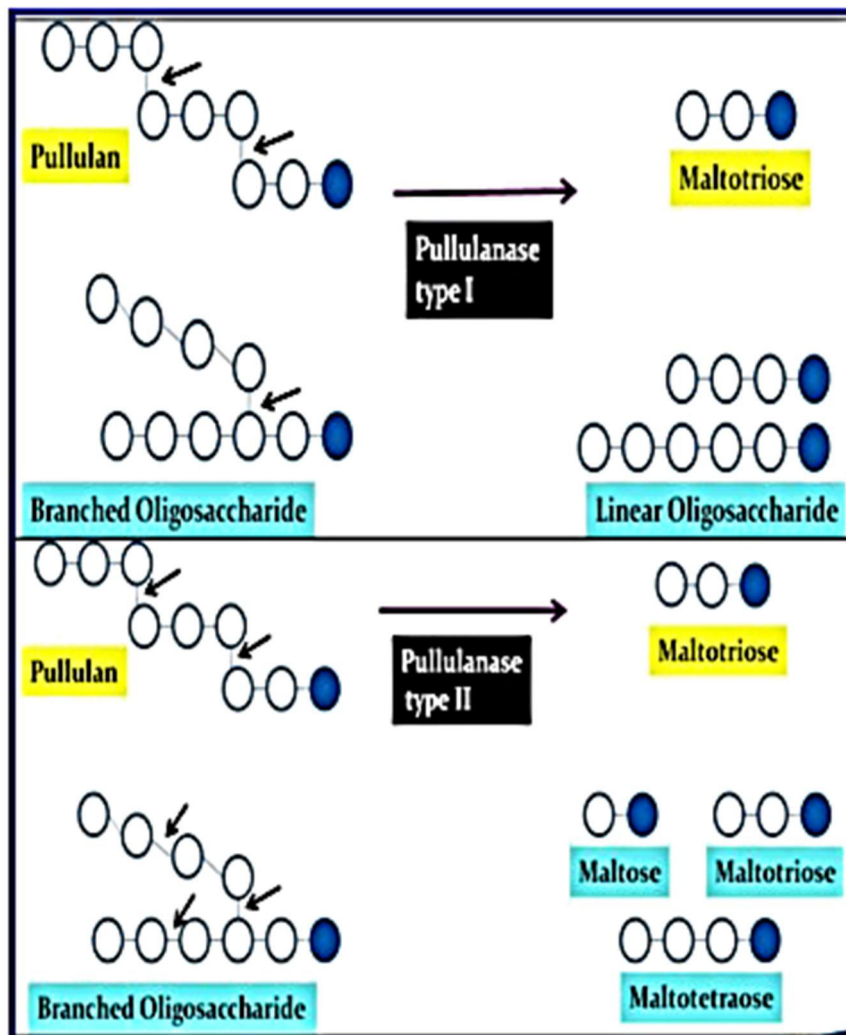
۱-۷ پلوانازها

پلوانازها (EC 3.2.1.41) یا همچنین آلفادکسترین ۶ گلوکانوهیدرولاز، پلوان ۶ گلوکانوهیدرولاز، دکستریناز و آمیلوپکتین ۶ گلوکانوهیدرولاز نیز نامیده می‌شود، که از میگرورگانسیم‌های مختلفی از جمله، *B. sp. AN-7*, *B. deramificans*, *Bacillus acidopullulyticus*, *Klebsiella planticola*, *Geobacillus stearothermophilus* و *B. cereus* FDTA-13 تولید می‌شود. پلوانازها بر اساس خصوصیتی که دارند، به دو تیپ I و II طبقه‌بندی می‌شوند. پلوانازهای تیپ I پیوندهای α -(1→6) آمیلوپکتین، بتادکسترین‌های مشتق شده از آمیلوپکتین و پلوان را هیدرولیز می‌کنند. برخی پلوانازهای تیپ I همچنین فعالیت کمی روی گلیکوژن دارند. در مقابل، پلوانازهای تیپ II هم پیوندهای α -(1→6) و هم پیوندهای α -(1→4) در نشاسته و پلوان را هیدرولیز می‌کنند، (شکل ۱-۵).

پلولانازها در ۵ زیر خانواده (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۳۹ و ۴۱) از خانواده GH13 و در خانواده GH57 یافت می-شوند.



شکل ۱-۴: آنزیم‌های تجزیه کننده پولان، آنزیم‌های تجزیه کننده پولان بر اساس اختصاصی بودن سویسترا و محصول نهایی به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند: پولان هیدرولاز تیپ I (نئوپولاناز، EC 3.2.1.135): پیوندهای α -(1→4) را هیدرولیز می‌کند و محصول آن پانوز است. پولان هیدرولیز تیپ II (ایزوپولاناز، EC 3.2.1.57): تولید ایزوپانوز از پولان را بر عهده دارد. پولان هیدرولاز تیپ III: پیوندهای α -(1→4) و α -(1→6) را هیدرولیز می‌کند و از پولان، مالتوتریوز، پانوز و مالتوز تولید می‌کند. پولاناز تیپ I (EC 3.2.1.41): به طور اختصاصی پیوندهای α -(1→6) را هیدرولیز می‌کند و محصول آن مالتوتریوز می‌باشد. پولاناز تیپ II (آمیوپولاناز): هم پیوندهای α -(1→6) و هم α -(1→4) را هیدرولیز می‌کند (Doman-Pytka & Bardowski, 2004)



شکل ۱-۵: شکل شماتیک عمل پلوانازهای I و II، همانطور که مشاهده می‌شود پلواناز I پیوند در پلوان و اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای را هیدرولیز کرده و مالتوتریوز و اولیگوساکاریدهای خطی آزاد می‌کند، اما پلواناز II پیوند در پلوان و پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 4) را در اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای هیدرولیز کرده که از هیدروایز پلوان مالتوتریوز و از هیدرولیز اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای مالتوز، مالتوتریوز و مالتوتتراز آزاد می‌کند (Nisha & Satyanarayana, 2016).

پلوانازهای تیپ I، در زیر خانواده‌های ۱۲ و ۱۴ خانواده GH13؛ در حالیکه، پلوانازهای تیپ II در همه ۵ زیر خانواده GH13 و در خانواده GH57 یافت می‌شوند.

۸-۱ پلوانازهای تیپ II (آمیلوپلوانازها)

پلوانازهای تیپ II (EC 3.2.1.1/41)، گروهی از آنزیم‌های شاخه شکن متعلق به خانواده گلیکوزیل هیدرولاز (GH)ها می‌باشند، که در طبقه‌بندی آنزیم‌های فعال بر کربوهیدرات بر اساس توالی‌هایشان قرار دارند (Cantarel et al., 2009). آنزیم‌های فعال بر روی کربوهیدرات‌ها در پایگاه داده‌ای CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) قرار گرفته‌اند (Henrissat et al., 2009). این آنزیم‌ها با توجه به ویژگی آنزیمی، گروه متنوعی از آنزیم‌ها می‌باشند. پلوانازهای تیپ II بر اساس تعداد جایگاه فعال در یک پروتئین به دو زیرگروه تقسیم می‌شوند: در گروه اول، یک دومین کاتالیتیکی هیدرولیز دو نوع پیوند را انجام می‌دهد، در گروه دوم، دومین آلفا آمیلاز پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) را هیدرولیز می‌کند و دومین پلواناز I، پیوندهای α -(1 \rightarrow 6) را هیدرولیز می‌کند (Ara et al., 1995). میکروارگانیسم‌های غیرهوازی ترموفیل آمیلوپلوانازهای با یک جایگاه فعال کاتالیتیکی تولید می‌کنند (Coleman et al., 1987)، در حالیکه آمیلوپلوانازهای میکروارگانیسم‌های هوازی دارای هم یک و هم دو جایگاه فعال کاتالیتیکی برای هیدرولیز پیوندهای α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 6) هستند (Lee et al., 1994). پلوانازها همچنین آمیلوپلواناز (دارای یک جایگاه فعال کاتالیتیکی و آمیلاز-پلواناز (دارای دو جایگاه فعال کاتالیتیکی) نیز نامیده می‌شوند (Melasniemi, 1988). پلوانازهای تیپ II در دو خانواده GH13 و GH57 قرار گرفته‌اند. آنزیم‌های خانواده GH13 از ۸ زنجیره موازی β تشکیل شده که توسط ۸ مارپیچ α احاطه شده است ((α/β)₈) و به نام TIM barrel خوانده می‌شود، که دارای زنجیره‌های β 4-آسپاراتات (هسته کاتالیتیکی)، β 5-گلوتامات (دهنده پروتون)، β 7-آسپاراتات (ثبیت انتقال) دارای ۴ تا ۷ توالی حفاظت شده می‌باشند (Kuriki & Imanaka, 1999; Janecek, 2014). آنزیم‌های خانواده GH57 در ساختار خود دارای (α/β)₇ (یک غلاف ناقص)، با تجهیزات کاتالیزوری β 4-آسپاراتات

(هسته کاتالیتیکی)، $\beta 5$ - گلوتامات (دهنده پروتون)، $\beta 7$ - آسپاراتات (ثبیت انتقال) و ۵ توالی حفاظت شده هستند. همه آمیلوپلوانازهای مزوفیل درون خانواده GH13، اما آمیلوپلوانازهای ترموفیل درون خانواده‌های GH13 و GH57 قرار دارند (Lin et al., 2008).

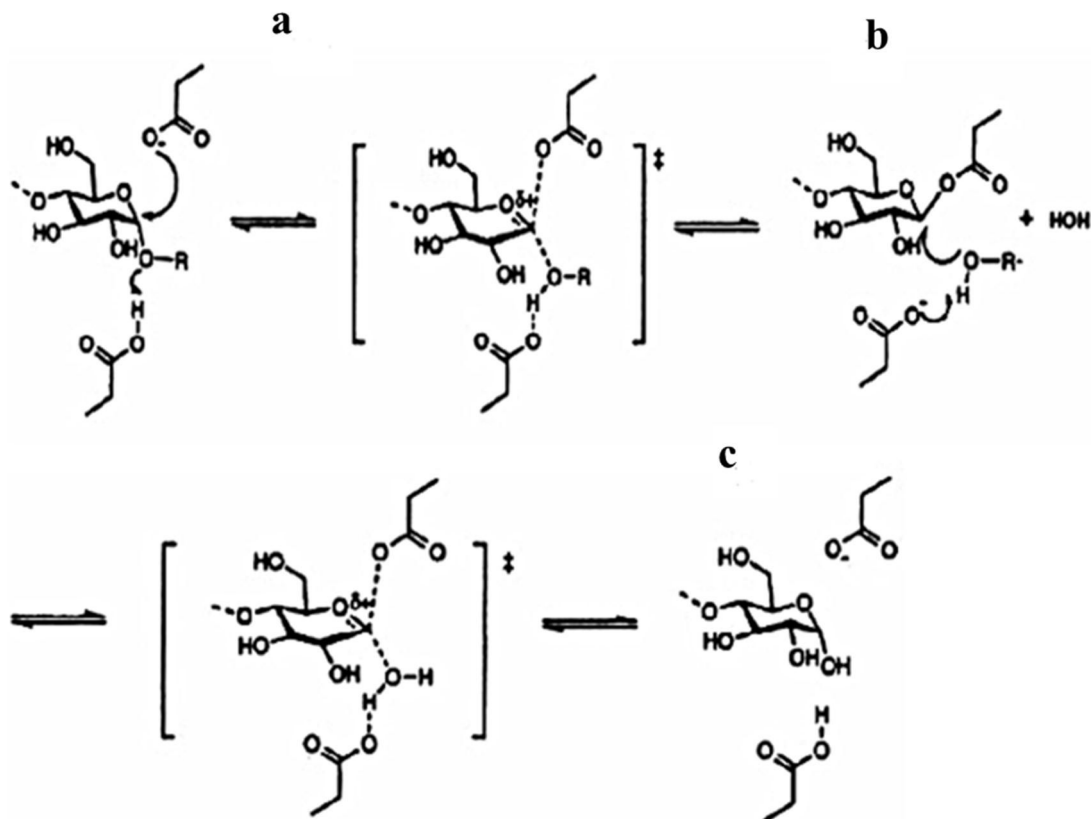
۹-۱ مکانسیم عمل پلوانازهای تیپ II

آمیلوپلوانازها می‌توانند پیوندهای گلیکوزیدی (α -(1 \rightarrow ۴) و α -(1 \rightarrow ۶) را در نشاسته، پلوان، آمیلوپکتین و دیگر اولیگوساکاریدهای مرتبط هیدرولیز کنند (Doman, 2004). نحوه عمل آنزیم در تمامی اعضای خانواده گلیکوزیل هیدرولازها مشابه یکدیگر می‌باشد (MacGregor et al., 2001). واکنش از طریق جانشینی دوگانه و حفظ کنفیگوراسیون^۱ (آرایش اتم‌ها که مشخص کننده ایزومر فضایی ویژه‌ای می‌باشد) آلفا پیش می‌رود. مکانسیم پیشنهادی شامل سه مرحله است (شکل ۱-۶). در مرحله اول اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتون دهنده Asp، پروتونه می‌شود. این مرحله با حمله نوکلئوفیلی Asp دیگری به کربن شماره ۱ گلوکزی در موقعیت ۱- و تشکیل یک حدواسط کووالان ادامه می‌یابد. پس از جدا شدن و ترک این قسمت از سوبسترا که گلوکز آن پروتون‌دار شده است، یک مولکول آب وارد و توسط یک اسید آمینه Glu که در مرحله قبل غیر پروتونه شده بود فعال می‌گردد، سپس مولکول آب فعال شده، پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱- را هیدرولیز می‌کند و بدین ترتیب چرخه کاتالیتیک کامل می‌گردد. قابل ذکر است که در حالتی که فعالیت ترانس گلیکوزیلاسیون^۲ اتفاق می‌افتد به جای آب یک سوبسترا، حاوی یک مولکول گلوکز در سر غیر احیایی خود وارد جایگاه می‌شود. بدین ترتیب با همان مکانسیم یک پیوند گلیکوزیدی آلفا تشکیل می‌گردد (Doman-Pytka & Bardowski, 2004; Hasan et al., 2006)

1. Configuration
2. Transglycosylation

۱-۱۰ کاربرد آمیلوپلوانازها

آمیلوپلوانازهای کاربردهای متنوعی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، کشاورزی و سوخت دارند. از جمله کاربردهای آمیلوپلواناز در ادامه آمده است.



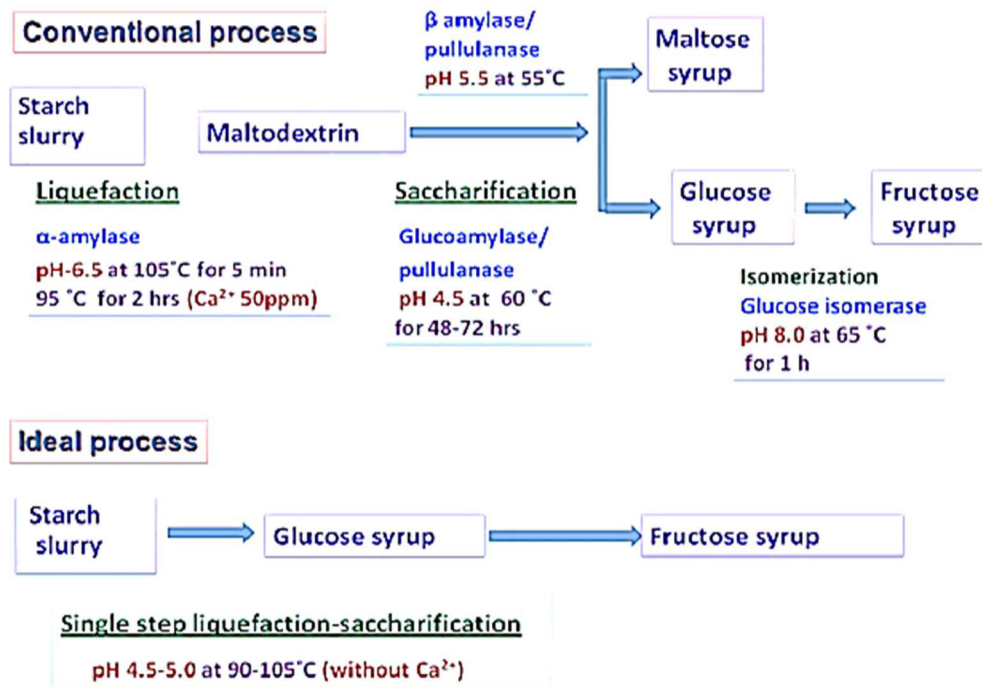
شکل ۱-۶: مکانیسم عمل پلوانازها، (a) اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتئین دهنده Asp، پروتونه می‌شود. (b) مولکول آب وارد و توسط اسید آمینه Glu فعال می‌گردد. (c) مولکول آب پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱-را هیدرولیز می‌کند (Hasan et al., 2006).

۱-۱۰-۱ صنعت قندسازی و محلول سازی نشاسته

پلوانازها در فرآیند قندسازی نشاسته صنعتی به منظور تولید شربت‌های مالتوز، مالتوتریوز، مالتوتروز به کار گرفته می‌شوند. شربت‌هایی که حاوی مالتوز و الیگوساکاریدها هستند، به صورت وسیع در صنایع غذا، نوشیدنی و داروسازی به کار می‌روند. در حال حاضر استفاده از پلوانازها موجب افزایش

غلظت گلوکز و مالتوز به ترتیب ۲٪ و ۲۰-۲۵٪، کاهش استفاده از آنزیم‌های گلوکوآمیلاز به مقدار ۵۰٪ و همچنین موجب کاهش زمان واکنش شده‌اند. آمیلوپولولانازها برای قندسازی و محلول سازی نشاسته به صورت تک مرحله‌ای کارا می‌باشند و می‌توانند جایگزین آلفاآمیلازها و بتاآمیلازها/گلوکوآمیلازها در فرایند قندسازی و محلول سازی نشاسته بشوند. سرعت قندسازی نشاسته با پیش تیمار نشاسته با آمیلوپولولاناز و به دنبال آن تیمار با گلوکوآمیلاز، نسبت به قندسازی با استفاده از گلوکوآمیلاز به تنهایی و نشاسته‌های تیمار شده با آلفاآمیلاز، بهبود یافته است (Nisha and Satyanarayana, 2014). تهیه آنزیم مقاوم به حرارت با دو فعالیت گلوکوآمیلازی و پلوانازی هم اکنون به طور تجاری با نام OPTIMAX® از Genencor در دسترس می‌باشد.

آنزیم برای استفاده کارآمد در صنعت نشاسته، باید مقاوم به حرارت و غیر وابسته به کلسیم باشد (شکل ۱-۷)، زیرا محلول سازی نشاسته نیاز به دمای بالا دارد، و یون Ca^{2+} آنزیم ایزومراز را در مرحله تبدیل گلوکز به فروکتوز و بالعکس مهار می‌کند، همچنین حذف Ca^{2+} در مراحل بعدی موجب افزایش هزینه‌ها می‌شود. مهندسی پروتئین با جهش‌زایی نقطه‌ای و تکامل جهت‌دار دروازه‌ای به بهبود ویژگی‌های آنزیمی به منظور استفاده کارآمد خود در صنعت دگرگونی نشاسته، باز کرده - است (Vieille & Zeikus, 1996; Lin et al., 2008; Kim et al., 2009; Nisha & Satyanarayana, 2013a, 2013b). شربت‌های با خلوص بالای مالتوز، دارای شیرینی کم، گرانی کم در محلول، رطوبت‌پسندی پایین و پایداری حرارتی خوبی هستند. این موضوع به خوبی برای کاربرد در فرآیندهای موادغذایی از جمله تولید آب نبات و بستنی با کیفیت بالا مورد مطالعه قرار گرفته است (Shaw & Sheu, 1992). در سال‌های اخیر تولید مالتوز با درصد خلوص بالا در صنعت داروسازی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. مالتوز را می‌توان به جای D-گلوکز برای تزریق داخل وریدی در



شکل ۱-۹: شکل شماتیک فرآیند قندسازی و محلول سازی نشاسته به صورت معمول و ایده آل، در فرآیند معمولی نشاسته به وسیله آنزیم‌های آمیلولیتیک‌های مختلفی به محلول نشاسته و قندهای ساده‌تر و با ارزش‌تر مانند گلوکز، مالتوز و فروکتوز تبدیل می‌شود. فرآیند ایده آل تبدیل نشاسته به محصولات ساده‌تر و نهایی با استفاده از یک آنزیم مقاوم به حرارت و شرایط اسیدی و همچنین غیروابسته به یون Ca²⁺ انجام می‌گیرد (Nisha & Satyanarayana, 2016).

غلظت بالا، بدون بالا رفتن گلوکز خون تجویز کرد (Shaw & Sheu, 1992).

شربت‌های با گلوکز بالا به عنوان منبع کربن در تخمیر و مواد غذایی برای ساخت شربت‌های با فروکتوز بالا استفاده می‌شوند (Nigam & Singh, 2001). شربت با فروکتوز بالا با تیمار شربت دکستروز به خصوص شربت با گلوکز بالا، با عمل گلوکز ایزومراز تولید می‌شود (Van der Maarel et al., 2002). شربت با فروکتوز بالا یک شیرین‌کننده کم‌کالری و با کیفیت است. این شربت کم‌کالری تر و ارزان‌تر اما ۱/۲ تا ۱/۸ برابر شیرین‌تر از ساکارز است (Guzman-Maldonad et al., 1995).

۱-۱۰-۲ مواد شوینده

بعضی پلولانازهای قلیایی به عنوان یک افزودنی در مواد شوینده ظرفشویی و لباسشویی برای از بین بردن نشاسته‌ها، در شرایط قلیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hatada et al., 2001; Sumi et al., 2014). اثربخشی این پلولانازهای قلیایی در شست‌وشو زمانی که آمیلوپولوناز در ترکیب با یک آلفاآمیلاز استفاده شود، می‌تواند افزایش پیدا کند، زیرا آمیلوپولوناز به تنهایی می‌تواند هیدرولیز هر دو نوع پیوند (۱→۴) و (۱→۶) را کاتالیز کند (Ara et al., 1995).

۱-۱۰-۳ صنعت پخت نان

آنزیم‌های عمل‌کننده بر نشاسته، ارزش اقتصادی بالایی در صنعت پخت نان، به عنوان عامل ضد بیاتی دارند. بیاتی به تغییرات نامطلوب مثل کاهش رطوبت نان، از بین رفتن طعم و مزه نان و ضخامت پوشش حفاظتی محصولات پخته شده گفته می‌شود. آنزیم‌هایی مانند آلفاآمیلاز، بتاآمیلاز، مالتوزنیک آمیلاز، آنزیم‌های شاخه‌شکن، آمیلوگلوکوزیدازها و آمیلوپولونازها به عنوان عامل ضد بیاتی و بهبود دهنده محصولات پخته شده گزارش شده‌اند (Nisha & Satyanarayana, 2016). بیاتی به دلیل از بین رفتن آمیلوپکتین نشاسته اتفاق می‌افتد (Champenois et al., 1999; Kulp & Ponte, 1981) و می‌تواند با کوتاه شدن زنجیره آمیلوپکتین به تعویق بیافتد. آنزیم‌های شاخه‌شکن، آمیلوپولونازها و پلولانازها (در ترکیب با آلفاآمیلازها) مالتودکسترین شاخه‌ای تولید شده به وسیله عمل آلفاآمیلازها را هیدرولیز می‌کند، بنابراین چسبندگی محصولات نانویی را از بین می‌برند (Nisha & Satyanarayana, 2016).

۱-۱۰-۴ تولید شاخه‌های سیکلودکسترین

از دیگر کاربردهای پلولانازها در تولید شاخه‌های سیکلودکسترین است. سیکلودکسترین‌ها سیکلوآمیروز، (سیکومالتوز یا دکسترین‌های شار‌دینگر)، نانوکپسول‌های طبیعی تشکیل شده از واحدهای گلوکزی هستند. الیگوساکاریدهای پر کاربرد طبیعی، آلفاسیکلودکسترین، بتاسیکلودکسترین

و گاماسیکلودکسترتین (به ترتیب شامل ۶، ۷، ۸ واحد گلوکز) هستند. با قرار دادن گروه‌های عاملی جدید در ساختار سیکلودکسترتین‌ها با استفاده از آنزیم پلواناز می‌توان برخی از خصوصیات آن‌ها مثل افزایش حلالیت در آب و حلال‌های آلی را بهبود بخشید و سمیت آن‌ها را کاهش داد. از سیکلودکسترتین‌ها می‌توان در صنایع داروسازی به عنوان حامل دارو و بهبود دهنده حلالیت مواد آبگریز با حلالیت کم (مانند داروی پیروکسیکام)، در صنایع غذایی به عنوان پوشاننده بو و مزه بد مواد و در مواد آرایشی به عنوان پوشاننده پوست در برابر نور خورشید بهره گرفت (Hasan, et al., 2006; Zhang et al., 2013).

۱-۱-۵ تولید سوخت‌های زیستی

از کاربردهای پلواناز می‌توان به تولید سوخت‌های زیستی اشاره کرد. هم‌اکنون سوخت‌های زیستی حدود ۱٪ کل مصرف سوخت‌های مایع در بخش حمل و نقل دنیا را تامین می‌کنند. اتانول زیستی طی فرآیند تخمیر، از گلوکز تولید می‌شود. بنابراین با تجزیه مواد نشاسته‌ای به گلوکز با استفاده از آنزیم پلواناز می‌توان قند مورد نیاز جهت تولید اتانول زیستی را تامین کرد (Zhang et al., 2013). این قندها به نوبه‌ی خود می‌توانند به عنوان پیش‌ماده برای تولید و یا محصولات تخمیری مانند اتانول استفاده گردند. تولید اتانول از منابع تجدیدپذیر به روش تخمیر نشان‌دهنده‌ی یک فرآیند مهم برای تولید سوخت‌های جایگزین است (Sukumaran, 2005). اتانول ترکیبی منحصربه‌فرد است که از ویژگی‌های آن از جمله انتشار کم گازهای گلخانه‌ای، سطح بالایی از پایداری و بدون اثر مخرب روی سیستم حمل‌ونقل می‌توان اشاره کرد (Singh et al., 2009).

۱-۱-۶ کاربرد در صنعت کشاورزی و ارزش اقتصادی پلوانازها

از صدها آنزیمی که به طور تجاری استفاده می‌شود بیش از نیمی از آن‌ها از قارچ و مخمر و بیش از یک سوم آن‌ها از باکتری‌ها و باقی مانده از حیوانات و گیاهان حاصل می‌شود. به طور کلی در صنعت، منابع جانوری و گیاهی به ترتیب تنها ۸ و ۳٪ از کل آنزیم‌ها را شامل می‌شوند و سایر آنزیم‌های مورد

استفاده، منشا میکروبی دارند (Hasan et al., 2006). بیشتر آنزیم‌هایی که از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند توسط میکروارگانیسیم‌ها تولید می‌شوند. از میان آنزیم‌هایی که توسط میکروارگانیسیم‌ها در بخش‌های مختلف، همچون داروسازی، کشاورزی و صنعت تولید شده است. ۲۵٪ بازار جهانی به آنزیم‌ها تعلق دارد. آنزیم‌های تولید شده در بخش صنعت با رشد قابل توجهی رو به رو بوده است به طوری که ارزش تولید صنعتی از یک میلیارد دلار در سال ۱۹۹۵ به یک و نیم میلیارد دلار در سال ۲۰۰۰ رسید و پیش‌بینی شده بود ارزش صنعتی آن‌ها، در سال ۲۰۱۳ به ۷ میلیارد دلار برسد (Fernandes, 2010). در این میان آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع تولید مواد شوینده، هیدرولیز مواد نشاسته‌ای و صنایع نساجی و تولید کاغذ بیشترین مقدار پیشرفت را به خود اختصاص داده‌اند. آنزیم آمیلوپولوناز نیز به دلیل فعالیت ویژه‌ای که دارا می‌باشد از لحاظ اقتصادی در صنعت هیدرولیز نشاسته از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یک مثال عملی از موفقیت‌های اقتصادی تولید این آنزیم می‌توان به تولید شربت ذرت حاوی فروکتوز زیاد از طریق فناوری آنزیمی اشاره کرد که سبب شد تا ارزش واردات شکر آمریکا از فیلیپین به میزان ۹۰ درصد (از ۶۰۰ میلیون دلار در سال ۱۹۸۰ به ۶۰ میلیون دلار در سال ۱۹۸۷) کاهش یابد. این نوع شربت، ۱/۷ برابر شیرین‌تر از نیشکر می‌باشد و قیمت آن نیز ۳۰ درصد کمتر از شکر است. البته ارزش اقتصادی آنزیم پلولوناز صرفاً از طریق کاربرد آن در بخش صنایع نیست بلکه با انتقال آن به گیاهان و تولید گیاه تراریخته حاوی این آنزیم نیز می‌توان به موفقیت‌های اقتصادی چشمگیری دست یافت. بازار جهانی بیوتکنولوژی کشاورزی در سال ۱۹۹۷ حدود ۴ میلیارد دلار بود و در سال ۲۰۰۲ به بیش از ۵ میلیارد دلار رسید. تولید گیاهان تراریخته از عمده‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی در کشاورزی می‌باشد. بازار جهانی صنعت تولید بذر گیاهان تراریخته در سال ۲۰۰۰ حدود ۳ میلیارد دلار بود و پیش‌بینی می‌شود که در سال ۲۰۲۵، حدود ۱ میلیارد و ۶۰۰ میلیون نفر در جهان از طریق غلات تغییر ژنتیک یافته تغذیه خواهند نمود. تولید برنج ترانسژنیک حاوی آمیلوپولوناز یکی از موفقیت‌های بشر در دسترسی به پروتئین‌های مفید

برنج از طریق انتقال این آنزیم به برنج بوده است (Chiang et al., 2005). برنج بزرگترین محصول غله در بین کشورهای آسیایی می‌باشد. این محصول غذای حدود ۵۰٪ از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. از نظر تغذیه کیفیت پروتئین‌های برنج بیش از پروتئین‌های گندم می‌باشد (Murata et al., 1973). اگر پروتئین برنج با دو اسید آمینه لیزین و ترئونین غنی شود، ارزش پروتئینی آن قابل مقایسه با پروتئین موجود در گوشت و لبنیات خواهد بود (Chang et al., 1981). به طور معمول محتوای پروتئین قابل دسترس برنج حدود ۲ تا ۱۰٪ است و این میزان برای کودکان و نوجوانان که پروتئین توصیه شده برای آن‌ها ۲۰ تا ۲۵٪ می‌باشد بسیار اندک است (Hansen et al., 1981). انتقال ژن‌های بیان کننده آمیلوپلواناز به اندوسپرم برنج سبب تولید دانه‌های برنج حاوی پروتئین‌های غنی از آمینواسیدهای مفید می‌شود. پروتئین‌های موجود در دانه‌های غلات در دام نشاسته به سر می‌برند و با انتقال ژن‌های بیان کننده آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته می‌توان پروتئین‌های مفید و همچنین اسیدهای آمینه ضروری همچون لیزین و ترئونین را در دسترس قرار داد و به این ترتیب ارزش غذایی غلات و در پس آن ارزش اقتصادی آن‌ها را افزایش داد (Chiang et al., 2005).

۱-۱۱ منابع تولید آنزیم‌های پلواناز

آنزیم‌های پلواناز نیز تاکنون از منابع مختلفی جداسازی شده است که اغلب آن‌ها، منابع باکتریایی بوده است. مزوفیل‌ها اولین گروه باکتریایی بودند که آنزیم‌های پلواناز از آن‌ها استخراج شد. در میان مزوفیل‌ها پلوانازها بیشتر از گونه‌های مختلف باسیلوس استخراج شده‌اند. ترموفیل‌ها نیز گروه دیگری از باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های پلواناز می‌باشند. آنزیم‌های پلواناز از تعدادی باکتری‌های ترموفیل مطلق نیز از جمله گونه‌های *Pyrococcus* (Rudiger et al., 1995, Dong et al., 1997)، *Thermococcus* (Brown & Kelly, 1993, Canganella et al., 1994, Erra-pujada et al., 1999) جداسازی شده‌اند. باکتری‌های ترموفیل مطلق به دلیل مقاومت

بالا در برابر حرارت از نظر تولید آنزیم بسیار مورد توجه هستند. این میکروارگانیسم‌ها متعلق به گروه آرکی باکترها هستند.

۱-۱۲ بیان هترولوگ پروتئین

برای تولید پروتئین در سطوح بالا بهتر است به جای منبع طبیعی آن از ارگانوسم‌های مهندسی شده استفاده کرد، زیرا منابع طبیعی تولید پروتئین‌ها محدود هستند. غلظت پروتئین مورد علاقه عموماً پایین است. استخراج آن بسیار پرهزینه و حتی غیرممکن می‌باشد و علاوه بر این‌ها پروتئین استخراج شده ممکن است آلوده به مواد توکسیک باشد. با ظهور کلونینگ مولکولی در ۱۹۷۱ امکان تولید پروتئین‌های خارجی در میزبان‌های جدید مهیا شد. حدود ۳۰٪ از پروتئین‌های دارویی در باکتری *E. coli*، ۲۰٪ در مخمر و ۵۰٪ در سلول‌های یوکاریوتی مثل سلول‌های پستانداران بیان می‌شوند. هر کدام از این میزبان‌ها معایب و مزیت‌هایی دارند. از مزیت‌های استفاده از باکتری *E. coli* می‌توان به وجود حامل‌های بیانی گسترده برای آن، تولید تعداد زیاد سویه‌های مهندسی شده *E. coli*، وجود استراتژی‌های فراوان برای کشت *E. coli* اشاره کرد (Rosano & Ceccarelli, 2014).

۱-۱۳ طراحی آزمایش به منظور انجام بهینه‌سازی

در صنایع مختلف، آزمایش‌هایی به منظور افزایش کیفیت و کمیت تولیدات انجام می‌شوند که این آزمایش‌ها

متغیرها و فرآیندهای دخیل در تولید محصولات را به صورت سیستماتیک مورد بررسی قرار می‌دهند. با توجه به محدودیت‌های انجام آزمایش‌ها، این نکته حائز اهمیت است که با انجام حداقل تعداد آزمایش‌ها، بیشترین اطلاعات را در زمینه تولید بهتر و با کیفیت‌تر به دست آوریم. طراحی آزمایش یکی از ابزارهای مهم آماری در راستای بهبود فرآیندهای تولید است که جهت شناسایی متغیرهایی تاثیرگذار بر روی فرآیند استفاده می‌شود. همچنین به منظور یافتن اثرات متقابل متغیرها و فاکتورهای

دخیل در فرآیند باید از آزمایشاتی با تغییر چند متغیر به صورت توامان و متفاوت استفاده شود، این آزمایش‌ها به دلیل اندازه‌گیری اثرات متقابل فاکتورها از اهمیت ویژه‌ای نسبت به انجام آزمایشاتی با یک متغیر برخوردار هستند. به کارگیری روش‌های طراحی آزمایش در مقایسه با روش‌های غیر آماری دارای مزایایی از جمله: کاهش هزینه‌ها، کاهش تغییرات، صرفه‌جویی در زمان از طریق انجام آزمایش کمتر و بهبود بازده است. طراحی آزمایشات اغلب در چهار مرحله انجام می‌شود که عبارت‌اند از: ۱- طرح‌ریزی یا برنامه‌ریزی ۲- گزینش یا غربالگری^۱ ۳- بهینه‌سازی^۲ ۴- تایید و اعتبار سنجی^۳.

۱-۱۳-۱ طرح ریزی یا برنامه ریزی

طراحی و برنامه ریزی دقیق اولیه از مشکلات احتمالی که ممکن است در حین انجام آزمایشات اتفاق بیفتد، جلوگیری می‌کند. به عنوان مثال، ممکن است پرسنل یا کارکنان، توانایی دستگاه‌ها و تجهیزات و جنبه‌های مکانیکی و اقتصادی سیستم، بر روی توانایی تکمیل فرآیند آزمایشات تاثیرگذار باشند. آماده‌سازی‌های قبل از شروع آزمایش‌ها به نوع مشکل بستگی دارد. مراحل زیر که برای شروع کار نیازمند انجام هستند شامل: تعریف مشکل (بیان مسئله)، تعیین هدف، ایجاد طرح آزمایشی که اطلاعات معناداری را در اختیار قرار می‌دهد، اطمینان از قابل اندازه‌گیری و تحت کنترل بودن شرایط و فاکتورهای موثر بر سیستم.

۱-۱۳-۲ غربالگری

در توسعه‌ی فرآیند و کاربردهای صنعتی، متغیرهایی که به‌طور بالقوه در فرآیند موثرند بسیار زیادند. غربالگری به وسیله‌ی شناسایی متغیرهای کلیدی موثر بر کیفیت تولید، باعث کاهش تعداد متغیرها می‌شود. این کاهش تعداد متغیرها امکان تمرکز و تلاش بیشتر بر روی متغیرهای مهم و واقعی و یا حیاتی را می‌دهد. از دیگر مزایای غربالگری می‌توان به معرفی تنظیمات بهینه اولیه برای فاکتورهای

موثر و نمایان شدن وجود یا عدم وجود منحنی در پاسخها اشاره کرد. هدف از انجام غربالگری فاکتورها شناسایی فاکتورهای مؤثر بر پاسخ است. معمولاً از سه روش زیر به منظور غربالگری فاکتورهای مؤثر استفاده می‌شود:

روش بررسی فاکتورهای دو سطحی که عموماً به‌طور گسترده در صنایع به کار می‌رود.

روش Full Factorial که روش رایجی است و معمولاً در بیشتر از دو سطح طراحی می‌شود. این روش برای انجام آزمایشات با تعداد فاکتورهای کم مفید و مورد تایید است.

روش پلاکت برمن^۱ که دارای کیفیت و وضوح پایینی است اما سودمندی آن در تعدادی از آزمایشات غربالگری و انجام آزمایشات قوی و مورد استناد به‌طور گسترده‌ای مشاهده شده است و از مزیت‌های این روش می‌توان به تعداد کم آزمایشات و به دست آمدن نتایج مطلوب و قابل استناد اشاره کرد. در این طرح آماری اثرات اصلی با تقابل‌های دوتایی قابل تفکیک نیست و به‌صورت خطی غربالگری فاکتورها را انجام می‌دهد (Plackett & Burman, 1946). هر یک از فاکتورها در این طرح آزمایشی در دو سطح مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای توضیح مدل فاکتورها از یک معادله چندجمله‌ای درجه اول استفاده می‌شود. در این معادله Y به‌عنوان پاسخ، x فاکتور مورد نظر، β_0 ضریب ثابت و β_i ضریب خطی است.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

(رابطه ۱-۱)

۱-۱۳-۳ بهینه‌سازی

پس از تعیین فاکتورهای اساسی و مؤثر به‌وسیله‌ی غربالگری، باید مقادیر و یا سطوح بهینه برای این فاکتورهای تاثیرگذار را با انجام آزمایشات مشخص شود. سطوح بهینه برای فاکتورها به هدف انجام

فرآیند بستگی دارند. به عنوان مثال، ممکن است هدف رسیدن به بیشترین میزان بازده فرآیند و یا کاهش توان تولیدی فرآیند باشد.

روش‌های بهینه سازی رایج با بیشتر از دو سطح برای هر فاکتور شامل: طراحی سطح پاسخ^۱، طراحی مخلوط^۲ و طراحی تاگوچی^۳ است.

طراحی RSM از جمله روش‌های بهینه سازی است که با استفاده از مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری، مسائل را مدل سازی می‌کند و نه تنها باعث می‌شود توسط شبیه سازی اجرای پرهزینه تمامی آزمایش‌ها کاهش یابد بلکه روند طبیعی بهینه سازی فرآیند را که اغلب غیرخطی است مدل می‌کند. هدف روش سطح پاسخ، بهینه سازی متغیر خروجی است که متاثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) است. این روش در سال ۱۹۵۱ توسط Wilson و Box معرفی شد (Lazic, 2006).

فرض کنید می‌خواهید بازده یک فرآیند شیمیایی (y) بیشینه شود. این بازدهی تابعی از سطوح دو فاکتور x_1 و x_2 است. رابطه‌ی بین پاسخ و متغیرهای غیر وابسته با استفاده از یک معادله درجه دوم توضیح داده می‌شود. در این معادله $\beta_1 x_1$ و $\beta_2 x_2$ اثرات اصلی^۴ و $\beta_5 x_1 x_2$ اثرات متقابل^۵ هستند.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_1 x_2$$

رابطه (۱-۲)

معادله درجه دوم به دست آمده به منظور توضیح رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ در قالب یک نمودار سه بعدی نشان داده می‌شود که نمودار سطح پاسخ سه بعدی نامیده می‌شود (شکل ۱-۱ a). برای به تصویر کشیدن بهتر شکل سطح پاسخ، معمولاً کانتور سطح پاسخ ارائه می‌شود (شکل ۱-۱ b).

1. Response Surface Methode (RSM)
2. Mixture design
3. Taguchi design
4. Main Effects
5. Interaction Effect

در رسم کانتوری، خطوط پاسخ ثابت در صفحه X_1 و X_2 نمایش داده می‌شود و هر کانتور مربوط به ارتفاع مشخصی از سطح پاسخ است.

برای طراحی و به دست آوردن مدل سطح پاسخ دو روش طرح مرکب مرکزی^۱ و باکس بنکن^۲ وجود دارد. طرح Central Composite که پرکاربردترین روش سطح پاسخ بوده، تعداد ۵ سطح را برای هر فاکتور اعمال می‌کند. طرح مرکب مرکزی برای برآزش مدل‌های مرتبه دو بکار گرفته می‌شود، که شامل 2K اجزای فاکتوری (مکعبی)، 2K اجزای محوری و تعدادی اجزای مرکزی است.

طرح باکس بنکن تعداد ۳ سطح را برای هر فاکتور اعمال می‌کند، برای برآزش مدل‌های مرتبه دو بکار گرفته می‌شود و تعداد آزمایش‌ها کمتر از طرح مرکب مرکزی است (Douglas, 2001).

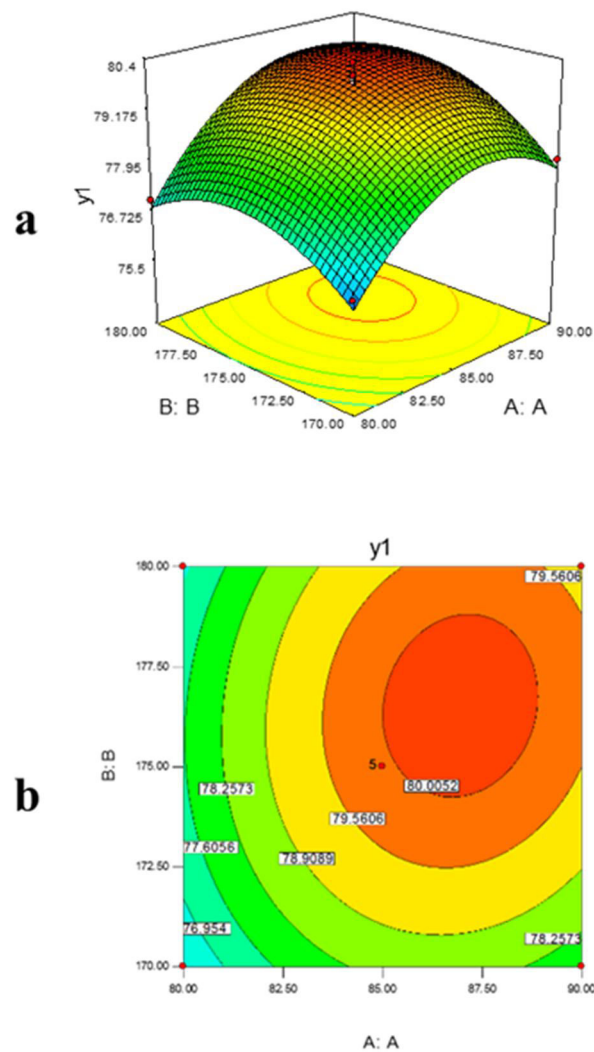
طراحی Mixture توصیفی از روش‌هایی که برای طراحی و تجزیه و تحلیل مرکز ثقل داده‌ها، شبکه داده و طراحی رئوس حاد است. طراحی مخلوط، یک طبقه خاص از طراحی سطح پاسخ به شمار می‌رود، جایی از آنکه اجزاء و فاکتورها به صورت متناسب و قرینه نسبت به دامنه‌شان قرار گرفته‌اند را در برمی‌گیرد، در واقع این مناطق از اهمیت بیشتری برخوردارند.

طرح Taguchi توصیفی برای طرح‌هایی با آرایه‌ی متعامد به شمار می‌رود که دارای طرح‌هایی قوی با طراحی‌های آرایه‌های بیرونی- درونی می‌باشند. این طرح‌ها برای ایجاد محصولاتی قوی و کارآمد با توجه به عوامل و شرایط محیطی‌شان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این طراحی می‌توان از فاکتورهایی با سطوح کیفی نیز استفاده کرد.

۱-۱۴ هدف از پژوهش

در حال حاضر آنزیم‌ها در تولیدات صنعتی گوناگون و فرایندها و حوزه‌های کاربردی جدید که به طور دائم در حال اضافه شدن هم هستند، استفاده می‌شوند. به لطف پیشرفت در بیوتکنولوژی مدرن،

امروزه آنزیم‌های کارآمدی می‌توانند ایجاد شوند که تا چند دهه‌ی قبل هیچ کس انتظار نداشت. معرفی آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورهای کارآمد منجر به ذخیره‌ی چشمگیر منابع مانند انرژی و آب به نفع صنعت، در تحقیق و محیط



شکل ۱-۸: (a) نمودار سطح پاسخ سه‌بعدی، به منظور توضیح رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ در قالب یک نمودار سه‌بعدی نشان داده می‌شود (b) رسم کانتوری سطح پاسخ، برای به تصویر کشیدن بهتر شکل سطح پاسخ، معمولاً کانتور سطح پاسخ ارائه می‌شود. در رسم کانتوری، خطوط پاسخ ثابت در صفحه X_1 و X_2 نمایش داده می‌شود و هر کانتور مربوط به ارتفاع مشخصی از سطح پاسخ است.

زیست می‌شود. در یک جهان با افزایش جمعیت سریع و نزدیک شدن به اتمام بسیاری از منابع، تکنولوژی آنزیم، پتانسیل بسیار عالی برای بسیاری از صنایع، به منظور برخورد با چالش‌هایی که در سال‌های آتی با آن مواجه خواهیم شد ارائه می‌کند. با توجه به این‌که نشاسته پلی‌ساکارید اصلی ذخیره گیاهان است و دارای کاربردهای وسیع در کشاورزی و صنایع گوناگون از جمله صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی، صنایع تولید کاغذ و نساجی می‌باشد، مطالعه فرآیند تولید و آنزیم‌های موثر بر هیدرولیز آن جهت تعیین نقاط بحرانی و رفع معضلات موجود در صنعت حائز اهمیت است. آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. آمیلوپولولاناز با داشتن دو فعالیت آمیلازی و پلولانازی در صنعت هیدرولیز نشاسته بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از سال ۱۹۸۰ تا به امروز مطالعات زیادی بر روی آنزیم‌های پلولاناز و افزایش سطح تولید آن انجام گرفته است، همچنین ژن آنزیم آمیلوپولولاناز از گونه‌های مختلف باکتری و آرکی باکتری استخراج و همسانه‌سازی شده است. با توجه با ارزش بالای اقتصادی آمیلوپولولاناز، همسانه‌سازی ژن این آنزیم به منظور استفاده در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر نیاز به آنزیم‌های صنعتی مقاوم به حرارت، موجب شد از آنزیم آمیلوپولولاناز باکتری گرما دوست *Cohnella* sp. A01 استفاده شود *Cohnella* sp. A01، یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، دارای اندوسپور و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد که از از سلسله: Bacteria، شاخه: Firmicutes، دسته: Bacilli، راسته: Bacillales، خانواده: Paenibacillaceae، جنس: *Cohnella*، گونه: A01 می‌باشد. در تحقیق حاضر، با فرض اینکه باکتری گرمادوست *Cohnella* sp. A01 ممکن است دارای آمیلوپولولاناز مقاوم به حرارتی باشد که انتخاب مناسبی جهت استفاده در فرآیندهای صنعتی باشد، هدف همسانه‌سازی و بیان ژن آمیلوپولولاناز باکتری *Cohnella* sp. A01 در یک حامل بیانی پروکاریوتی، تخلیص این آنزیم نو ترکیب و تعیین خصوصیات آن به منظور کاربرد در صنعت می‌باشد. در فصل بعدی مراحل همسانه‌سازی، بیان،

فصل دوم

مروری بر منابع

آمیلوپولولانازها هم به وسیله باکتری‌های هوازی هم غیرهوازی تولید شده‌اند، گونه دوم بیشترین تولید را به خود اختصاص داده‌است (Coleman et al., 1987). در میان باکتری‌های هوازی، گونه‌های شاخص برای تولید آمیلوپولولانازها *Bacillus* و *Geobacillus* شناخته شده‌اند، که اغلب گرمادوست هستند (Takasaki, 1987, Shen et al., 1990, Sang-pil et al., 1994, Ara et al., 1995, Lin et al., 1996, Brunswick et al., 1999, Vishnu et al., 2006, Roy et al., 2003, Noorwez et al., 2006 و Zareian et al., 2010). به عنوان منابع تولیدکننده آمیلوپولولاناز گزارش شدند. در میان باکتری‌های بی‌هوازی گرمادوست، گونه‌های *Clostridium* (Hyun & Zeikus 1985; Melasniemi, 1987, Saha et al., 1990, Spreinat & Antranikian, 1990). گونه‌های *Thermoanaerobium* (Coleman et al., 1987, Plant et al., 1987, Koch et al., 1987, Ganghofner et al., 1998). گونه‌های *Thermococcus* (Mathupala & Zeikus, 1993, Bibbel et al., 1998) و *Thermotoga maritime* (Kwak et al., 1998) به عنوان تولیدکننده‌های آمیلوپولولاناز شناسایی شدند. آمیلوپولولانازهای خانواده GH57 از آرکی‌باکتری‌های *Pyrococcus* (Rudiger et al., 1995, Dong et al., 1997, Erra-pujada et al., 1994, Brown & Kelly, 1993) *Thermococcus* (Nisha & Satyanarayana, 2013b al., 1999) تولید شده‌اند.

سطح تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته در میزبان‌های طبیعی کافی نیست، به همین دلیل همسازسازی و بیان ژن‌های مسئول در میزبان‌های همولوگ و هترولوگ که مهندسی شده‌اند، دروازه-ای را به روی بهبود عملکرد پروتئین‌ها باز کرده‌اند (Canganella et al., 1994).

تا به حال تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده آمیلوپولولانازها کلون و جنبه‌های بیانی آن‌ها بررسی شده است.

در سال ۱۹۸۷ برای اولین بار کولمن و همکاران ژن آمیلوپولولاناز را از یک باکتری بی‌هوازی گرمادوست، *T. Brockii*، درون *E. coli* و *Bacillus subtilis* کلون کردند (Coleman et al., 1987).
آمیلوپولولانازها همچنین از دیگر باکتری‌های بی‌هوازی گرمادوست از جمله، *C. thermohydrosulfuricum* (Melasniemi, 1987)، *T. saccharolyticum* (Ramesh et al., 1994)،
T. ethanolicus (Mathupala et al., 1993 ; Lin & Leu, 2002) درون باکتری *E. coli* کلون و بیان شدند.

در بین باکتری‌های هوازی، ژن‌های باکتری *Bacillus* sp. KSM1378 (Sang-pil et al., 1994)، *B. sp. strain XAL601* (Nisha & *G. thermoleovorans* NP33 و *B. stearothermophilus* TS-23،
Satyanarayana, 2013b) در *E. coli* کلون و بیان آن‌ها بررسی شده است.

ژن آمیلوپولولاناز *B. sp. KSM-1378* همچنین در باکتری *B. subtilis* بیان شد (Nisha & Satyanarayana, 2013b).

ژن آمیلوپولولاناز باکتری اسیدلاکتیک *Lactobacillus plantarum* L137 در *L. plantarum* NCL21 کلون و بیان شد (Kim et al., 2008).

سطح تولید آمیلوپولولانازها در سویه‌های نوترکیب در مقایسه با گونه‌های طبیعی افزایش پیدا کرده است؛ به‌طوری‌که بیش از ۴ برابر تولید آنزیم آمیلوپولولاناز *L. plantarum* L137 درون میزبان نوترکیب *L. plantarum* NCL21 نسبت به میزبان طبیعی بیشتر شده است (Kim et al., 2008).
در *B. subtilis* نوترکیب، حامل ژن آمیلوپولولاناز *T. Brockii*، تولید آنزیم $4/3 - 3/4$ برابر نسبت به میزبان طبیعی گزارش شد (Coleman et al., 1987).

طول توالی ژن آمیلوپولولانازهای خانواده GH13 و GH57 زیاد است. پروتئین معمولا در بین گلیکوزیل هیدرولازها وزن بالایی دارد. گستره وزن مولکولی آمیلوپولولانازها ۲۵۰ - ۸۰ کیلودالتون گزارش شده است (Nisha & Satyanarayana, 2013b).

دمای بهینه فعالیت آمیلوپولولانازهای *L. plantarum* L137 (Kim et al., 2008) و *Bacillus* sp. KSM-1378 (Nisha & Satyanarayana, 2013b)، ۴۰ - ۵۰ درجه سانتی گراد، در حالیکه دمای بهینه آمیلوپولولانازهای *T. saccharolyticum* B6A-RI (Ramesh et al., 1994) و *B. sp. strain* XAL601 (Sang-Pil et al., 1994) بین ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی گراد گزارش شده است. دمای بهینه آمیلوپولولاناز *C. thermohydrosulfuricum* DSM 3783 در حضور ۵ میلی مولار Ca^{2+} ، برای فعالیت آمیلازی و پلوانازی به ترتیب ۸۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد گزارش شده است (Lin & Leu, 2002). گستره دمایی برای فعالیت آمیلوپولولانازها حدودا ۴۰ - ۱۱۰ درجه سانتی گراد می باشد.

گستره pH برای فعالیت آمیلوپولولانازها از اسیدی تا بازی می باشد (Nisha & Satyanarayana, 2013b).

آمیلوپولولانازهای باکتری‌های مختلف رفتار متفاوتی در برابر یون‌های فلزی برای فعالیت از خود نشان می دهند. بعضی آمیلوپولولانازها به یون‌های فلزی احتیاج دارند، بعضی به وسیله یون‌های فلزی مهار می شوند و بعضی نیز تحت تاثیر یون‌ها قرار می گیرند. فعالیت آلفا آمیلازی و پلوانازی آنزیم *T. ethan* *licus* 39E در حضور Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Ba^{2+} تحریک اما در حضور Hg^{2+} ، Ni^{2+} ، Zn^{2+} و Fe^{2+} مهار می شود (Lin & Leu, 2002). Hg^{2+} و Cu^{2+} فعالیت آمیلازی و پلوانازی آمیلوپولولاناز *L. plantarum* L137 را مهار، در حالیکه Co^{2+} فعالیت را تحریک می کند (Kim et al., 2008). Zn^{2+} فعالیت آمیلوپولولاناز *G. thermoleovorans* NP33 را تحریک، در حالیکه فعالیت آن در حضور Hg^{2+} و Cu^{2+}

به طور کامل از بین می‌رود، در حدود نیمی از فعالیت آنزیم در حضور Fe^{2+} و Mg^{2+} ، از بین می‌رود اما یون‌های Ca^{2+} و Mn^{2+} ، Co^{2+} تاثیر بر فعالیت آنزیم ندارند (Nisha & Satyanarayana, 2013b).

آمیولوپولونازهای خانواده GH13، طبقه بندی مشخصی در سیستم زیرخانواده‌ها در CAZy ندارند. در بعضی موارد، یک پولوناز تیپ II-زیرگروه II، هم در زیرگروه‌های ۱۲ و ۱۴ خانواده GH13 پولوناز I (GH13_12-14) و هم در یک زیر گروه از آلفاآمیلازها قرار گرفته است.

اکثر پولونازهای تیپ II-زیرگروه II در GH13_12+41 از گونه‌های *Streptococcus suis* می‌باشند. ویژگی آنزیمی فقط برای ۴ پولوناز تیپ II از GH13_12-14 گزارش شده است: یک پولوناز تیپ II-زیرگروه I از *Lactobacillus plantarum* (GH13_14, BAF93906, Kim et al., 2009; Kim et al., 2008) و سه پولوناز تیپ II-زیرگروه II از *S. suis* (GH13_12, CAR47543)، فقط دومین آمیلازی تعیین خصوصیت شده است)، *Bifidobacterium breve* (GH13_14) و 32_GH13 (AAY89038) و *B. sp.* KSM-1378 (GH13_12 و GH13_41) (Moller et al., 2016).

اخیرا، یک آنزیم شاخه‌شکن آلفاگلوکان از یک باکتری غیر قابل کشت از روده *Hermetia illucens* تعیین خصوصیت شده است (Lee et al., 2016). بخشی از توالی آن در پایگاه داده‌ای GenBank (AGL50935) قرار داده شده، و بر اساس خصوصیات آنزیمی تعیین شده و اطلاعات پایگاه داده‌ای دومین‌های حفاظت شده^۱ (CDD) جز زیرگروه II پولوناز تیپ II قرار گرفته است (Lee et al., 2016; Marchler-Bauer et al., 2015). دومین آمیلازی این آنزیم در زیر خانواده آلفاآمیلاز (GH13_28) طبقه بندی شده؛ اما دومین پولونازی در هیچ زیرخانواده‌ای قرار نگرفته است (Lombard et al., 2014).

زیرخانواده GH13_39 یک زیرخانواده کوچکی (به لحاظ توالی آنزیمی) از پولونازهای تیپ II با میزبان باکتریایی، به ویژه نوع گرمادوست می‌باشد. این آنزیم‌ها بر اساس اطلاعات CDD، دارای یک ناحیه کاتالیتیکی برای هیدرولیز هر دو نوع پیوند α -(1 \rightarrow 4) و α -(1 \rightarrow 6) هستند (Marchler-Bauer et al., 2015). آنزیم‌های GH13_39، با توجه به تعداد و نوع دومین‌های اضافه بر دومین کاتالیتیکی، فرم واحدی ندارند. اخیراً، ۶ توالی پروتئینی دارای هر ۲ دومین کاتالیتیک GH13 و GH77، به زیرخانواده GH13_39 اضافه شده است (Lombard et al., 2014). این تیپ جدید پروتئین هنوز تعیین خصوصیت نشده است. هیچ ساختاری از زیرخانواده GH13_39 پولونازهای II در دسترس نیست؛ اما آنزیم‌های GH13_39 از گونه‌های *Geobacillus*، *Bacillus*، *Alicyclobacillus* و *Thermoanaerobacter* (Moller et al., 2016). برای برخی از آنزیم‌های این زیرخانواده سوبسترای ویژه‌ای تعریف نشده است. برخی از این آنزیم‌ها به عنوان یک آمیلاز با فعالیت مولکولی بالا در مطالب قدیمی‌تر اشاره شده است، با اینکه همه‌ی آن‌ها هم نشاسته و هم پولان را هیدرولیز می‌کنند، پولاناز باکتری *Alicyclobacillus* (ADZ99363) در زیرخانواده GH13_39 به عنوان یک آلفا آمیلاز توصیف شده است (Bai et al., 2012). آنزیم پولوناز تیپ II-زیرگروه II از باکتری *G. thermoleovorans* یکی از بهترین اعضای GH13_39 می‌باشد. این آنزیم مالتوز، مالتوتریوز و مالتوتتراز را از نشاسته، گلیکوژن، آمیلوز و آمیلوپکتین، در حالیکه با هیدرولیز پولان فقط مالتوتریوز آزاد می‌کند. مالتوز و مالتوتریوز محصول نهایی از هیدولیز مالتوپنتوز می‌باشند (Nisha & Satyanarayana, 2013a). پولوناز تیپ II-زیرگروه I از باکتری‌های *B. sp. XAL601*، *T. saccharolyticum* و *T. pseudoethanolicus*، مالتوز، مالتوتریوز و مالتوتتراز را از نشاسته و از هیدولیز پولان، مالتوتریوز آزاد می‌کنند (Lee, 1994; Ramesh et al., 1990; Mathupala et al., 1994). آنالیز موتاسیونی تایید می‌کند که آنزیم با منشا *T.*

pseudoethanolicus دارای یک ناحیه کاتالیتیکی ویژه هیدرولیز پیوندهای α -(۱→۴) و α -(۱→۶) می‌باشد.

به طور کلی، پلوانازهای تیپ II-زیرگروه I، قادر به هیدولیز پیوند α -(۱→۶)، در حالیکه زیرگروه II این آنزیم‌ها قادر به هیدولیز هر دو پیوند α -(۱→۴) و α -(۱→۶) در پلوان می‌باشند. پلواناز تیپ II-زیرگروه I از *Anoxybacillus* sp. SK3-4 (GenBank EPZ37192) یک استثنا بوده، چون محصولات حاصل از تجزیه پلوان مخلوطی از گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز بوده (Kahar et al., 2013) و در پایگاه داده‌ای CAZy قرار نگرفته است. این آنزیم برای هیدورلیز، پیوند α -(۱→۶) را به α -(۱→۴) در پلوان، بیشتر ترجیح می‌دهد (Kahar et al., 2013)

آمیلوپلوانازهای خانواده GH57 پلوانازهای تیپ II-زیرگروه I از چندین آرکی‌باکترهای بسیار گرمادوست تعیین خصوصیت شده‌اند، از جمله، *Caldivirga* (Li & Li, 2015)، *Pyrobaculum* (Moller et al., 2016)، *Pyrococcus* (Dong et al., 1997)، *S. acidocaldarius* (Hwa & Jaeho, 2015)، *Staphylothermus* (Li & Park, 2013) و *Thermococcus* (Guan et al., 2013; Jiao et al., 2011; Erra-pujada et al., 1999). ساختار هیچ کدام از اعضای پلواناز تیپ II-زیرگروه I خانواده GH57 تعیین نشده است؛ اما پیشنهاد می‌شود که یک ناحیه کاتالیتیکی برای فعالیت بر روی هر دو پیوند α -(۱→۴) و α -(۱→۶) دارند، و هیچ واحد متصل به کربنی^۱ مرتبط با دومین کاتالیتیکی آن‌ها شناخته نشده است (Moller et al., 2016). با این حال، با بررسی خصوصیات پلوانازهای تیپ II-زیرگروه I در CDD حضور چندین دومین اضافی را شناسایی کرده است (Marchler-Bauer et al., 2015). شایان ذکر است که پیشنهاد شده پلواناز تیپ II-زیرگروه I از باکتری *Thermococcus siculi* دارای دو دومین شبه CBM9 است،

۱. به عنوان یک توالی اسیدآمینو در درون یک آنزیم با فعالیت کربوهیدراتی، با یک فولد جداگانه دارای فعالیت وابسته به کربوهیدرات تعریف می‌شود (Carbohydrate binding modules با نام اختصاری CBS).

که معمولاً این دومین‌ها در ناحیه C-ترمینال زایلانازها پیدا می‌شوند (Jiao et al., 2011). مشخصات برخی از آنزیم‌های آمیلوپولولاناز که تا کنون از باکتری‌های مختلف شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیت شده‌اند در جدول ۱-۲ آورده شده است.

جدول ۱-۲: مشخصات برخی از آمیلوپولولانازها که از باکتری‌های مختلف جداسازی و تعیین خصوصیت شده است.

نام میکروارگانیسم	دما اپتیمم (°C)	pH	فعال کننده	بازدارنده	وزن پروتئین (kDa)	منبع
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	۶۰	۷	Triton X-100 Tween80	Hg ²⁺ , EDTA	۱۵۵	(Nisha & Satyanarayana, 2015)
<i>Caldivirga maquilingsis</i>	۱۰۰	۵	-	-	۶۲/۷	(Li & Li, 2015)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM639	۹۵-۱۰۵	۳	Co ²⁺ , Mg ²⁺	SDS	۱۰۰	(Choi & Cha, 2015)
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E	آلفا آمیلاز: ۹۰ پولولاناز: ۸۰	۶	Ca ²⁺	EDTA	۱۰۹	(Pang lin & Lin leu, 2002)
<i>Staphylothermus marinus</i>	۱۰۵	۵	-	Zn ²⁺ , Cu ²⁺	۷۵/۳	(Li et al., 2013)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (gt-apu)	۶۰	۷	Triton X-100 Tween80	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	۱۸۲	(Nisha & Satyanarayana, 2013a)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (gt-apuT)	۶۰	۷	Triton X-100 Tween80	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	۱۵۰	(Nisha & Satyanarayana, 2013a)
<i>Bacillus subtilis</i> DR8806	۷۰	۹/۵	Hg ²⁺ , Zn ²⁺	Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Al ³⁺	۶۵/۵	(Asoodeh & Lagzian, 2012)
<i>Thermococcus siculi</i> (TsiApu)	۹۵	آلفا آمیلاز: ۵ پولولاناز: ۶	Ca ²⁺	-	۱۴۸/۶	(Jiao et al., 2011)
<i>Thermococcus siculi</i> (TsiApuN)	۱۰۰	آلفا آمیلاز: ۵ پولولاناز: ۶	Ca ²⁺	-	۹۵	(Jiao et al., 2011)
<i>Thermococcus siculi</i> (MTsiApuN)	۱۰۰	آلفا آمیلاز: ۵ پولولاناز: ۶	Ca ²⁺	-	۱۳۱	(Jiao et al., 2011)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	۸۰	۷	-	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	۱۰۵	(Nisha & Satyanarayana, 2014)
Iranian <i>Bacillus</i> sp.	۶۵	۷	Ca ²⁺	EDTA, Phytic acid	۹۳	(Zareian et al., 2010)
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i> svm17	۷۰	۵	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , Ce ²⁺ , Co ²⁺	۹۷	(Mrudula, 2010)
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	۱۱۰-۱۰۵	۵-۵/۵	-	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , EDTA	۱۲۵	(Guan et al., 2013)

فصل سوم

مواد و روش ها

۱-۳ مواد

اتانول، اتیدیوم بروماید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، استون، استیک اسید، اکریل آمید، ایزوبوتانول، ایزوپروپانول، ایمیدازول، آگارز، آمونیوم پر سولفات، بتامرکاپتواتانول، بروموفنول بلو، بیس آکریل آمید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، پتاسیم فسفات، تریتون X-۱۰۰، تریس بازی، تریس هیدروکلرید، توپین ۲۰، توپین ۸۰، دی تیوتریتول (DDT)، سدیم استات، سدیم آزید، سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، سدیم هیدروکسید، سولفات روی، سولفات مس، کلرید آهن (II)، کلرید آهن (III)، کلرید باریم، کلرید پتاسیم، کلرید سدیم، کلرید کبالت، کلرید کلسیم، کلرید لیتیم، کلرید منگنز، کلرید منیزیم، کلریدریک اسید، کوماسی بلو G-۲۵۰، گلوکز، گلیسرول، گلیسین، گوانیدین هیدروکلراید، متانول، نیترات نقره و یدو استامید، ساخت شرکت (Darmstadt, Germany) Merck، ایزوپروپیل بتا دی ۱-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG)، آنزیم T4 لیگاز، آنزیم *pfu* پلیمرز (Master mix)، آنزیم پروتئیناز K، آنزیم RNase A، آنزیم *Nde* I، آنزیم *Not* I، نشانگر اندازه مولکول DNA (۱Kb) و نشانگر وزن مولکولی پرتئین و حامل pET-26b(+) با اندازه ۵۳۶۰bp، ساخت شرکت Fermentase (Burlington, Canada)، آنزیم *Taq* پلیمرز (Maser mix) شرکت ویراژن (آمریکا)، ۳-۵ دی نیترو سالیسیک اسید (DNS)، پلوان، فنیل متیل سولفونیل فلئورید (PMSF)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، مالتوز و نشاسته، آنتی بیوتیک کانامایسین Sigma (غلظت ۳۰ mg/ml) ساخت شرکت Sigma (Steinheim, USA)، کیت استخراج DNA ساخت شرکت Peqlab (Wilmington, USA)، کیت تخلیص محصول PCR و کیت استخراج پلاسمید ساخت شرکت GenAll (Seoul, South Korea)، باکتری های *Escherichia coli* DH5 α و باکتری *Escherichia coli* BL21 ساخت شرکت Invitrogen، محیط کشت های LB مایع^۱ (تریپتون ۱٪ (w/v)، NaCl ۱٪ (w/v)، عصاره مخمر^۳ ۰/۵٪

1. Luria-Bertani (LB) broth
2. Triptone
3. Yeast extract

(w/v)، آب مقطر)، LB جامد^۱ (تریپتون ۱٪ (w/v)، NaCl ۱٪ (w/v)، عصاره مخمر ۰/۵٪ (w/v)، آگار ۱/۵٪ (w/v)، آب مقطر) و NB^۲ (پودر NB ۲٪ (w/v) و آب مقطر)، تهیه گردید.

pH متر مدل 72 pH METR و اسپکتروفوتومتر مدل DU530 ساخت شرکت Beckman (Gersey, USA)، انکوباتور شیکردار مدل 3033 ساخت شرکت GFL (Gujarat, India)، تانک الکتروفورز افقی مدل SEU7305 و تانک الکتروفورز عمودی مدل VSS1100 ساخت شرکت پایا پژوهش پارس (تهران، ایران)، ترازو مدل PG603-S و ترازوی حساس مدل AG285 ساخت شرکت Mettler (Toledo, Ohio, USA)، تیوب هیتر مدل FDB02DD و مولد چرخه حرارتی^۳ مدل FFFG05TUD ساخت شرکت TECHNE (Burlington, USA)، سانتریفیوژ یخچال‌دار، میکروفیوژ و میکروفیوژ یخچال دار مدل D37520 ساخت شرکت KENDRO (Asheville, USA)، سونیکاتور مدل UP200S ساخت شرکت Hielscher (Ringwood, USA)، نانودراپ مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت Thermo scientific (Massachusetts, USA)، ورتکس-اسپین مدل MICRO-SPIN ساخت شرکت KIAGEN (Hilden, Germany)، همزن مغناطیسی^۴ مدل T8.10 ساخت شرکت IKA (Breisgau, Germany)، هود شیمیایی و هود میکروبی مدل STS-AII102 ساخت شرکت سرو تجهیز سکو (تهران، ایران) تهیه گردید.

۲-۳ بررسی‌های بیوانفورماتیک

توالی ژنی مورد مطالعه آمیلوپلولاناز ۱۱۳۶ (*Amy1136*) دارای ۲۱۶۶ باز می‌باشد. توالی مورد نظر ابتدا با استفاده از نرم افزار آنلاین Translate tool (<http://web.expasy.org/translate>) ترجمه و با نرم افزار آنلاین <http://web.expasy.org/protparam>، خصوصیات آنزیم مورد بررسی گردید. برای محاسبه خصوصیات بیوشیمیایی از جمله وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص ناپایداری،

1. Luria-Bertani (LB) Agar
2. Nutrient Broth
3. Thermocycler
4. Stirrer



ضریب آلیفاتیک و بار خالص پروتئین مورد نظر از نرم افزار ProtParam استفاده شد. همچنین آنزیم های آمیلوپولاناز در دیگر میکروارگانیسم های گرمادوست از پایگاه داده ای <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> گرفته شد و در ادامه به منظور بررسی روابط تکاملی توالی آمینواسیدی آنزیم مورد نظر با آنزیم های مشابه با استفاده از نرم افزار Mega6 مقایسه و درختچه فیلوژنتیک مربوط به آمینواسیدهای آنزیم مورد نظر رسم گردید.

۳-۳ روش ها

۳-۳-۱ کشت باکتری *Cohnella* sp. A01 و استخراج DNA ژنومی

به منظور دستیابی به DNA ژنومی، ابتدا مقداری (۱۰ μl) از استوک باکتری گرما دوست *Cohnella* sp. A01، در محیط NB کشت داده شد، و به مدت ۳ شبانه روز در دمای ۵۰ °C قرار گرفت. ۱۰^۹ باکتری سانتیفریوژ و محلول رویی دور ریخته شد. استخراج DNA با استفاده از کیت Peqlab و مطابق با پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. کیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

۳-۳-۲ تکثیر ژن *Amy1136* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز^۱

تکثیر ژن *Amy1136* با استفاده از آنزیم *pfu* پلیمرز صورت گرفت. مخلوط واکنش به حجم ۲۰ μl شامل ۱ μl از هر یک از پرایمرهای F (-) و

3'-CTTCATATGATGTCTTTGAAAAAGAAAGTACGGCGGG-5' R و

3'-CTTGCGGCCGCGCCTTAGCATTGAGTGCGCG-5' طراحی شده ژن *Amy1136* (با

غلظت ۱۰ pmol)، ۱۰ μl Master mix (شامل آنزیم *pfu*، MgSO₄، dNTPs، PCR Buffer)، ۷ μl

آب دیونیزه (dd H₂O) و ۱ μl DNA کوهنلا با غلظت ۴۰ ng/μl در یخ تهیه شد. واکنش PCR با

برنامه ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ °C (جهت واسرشت سازی اولیه)، ۳۵ سیکل به صورت ۱ دقیقه دمای ۹۴

۹۴ برای واسرشت سازی DNA، ۱ دقیقه دمای ۵۷ °C برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (با توجه

به T_m پرایمرها)، ۲ دقیقه دمای 72°C برای عمل آنزیم *pfu* پلیمرز و تکثیر، ۵ دقیقه دمای 72°C برای تکثیر نهایی و در آخر ۵ دقیقه دمای 4°C برای نگهداری در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. پس از آن محصول PCR بر روی ژل آگارز (۱٪) برده شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تکثیر ژن *Amy1136* مجاورت نور UV بررسی گردید.

پس از الکتروفورز محصول PCR و رنگ آمیزی با متیلن بلو باند تکثیری پس از تایید از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل با توجه به دستورالعمل شرکت تهیه شده سازنده ریکاوری شد. برای بررسی روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و غلظت آن توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد.

۳-۳-۳ استخراج حامل بیانی pET-26b(+)

برای همسانه سازی و همچنین بیان ژن نو ترکیب از وکتورهای pET در این پژوهش از وکتور pET-26b(+ استفاده گردید. اندازه این وکتور ۵۳۶۰ جفت باز می‌باشد. افزودن توالی‌های سیگنال پپتید به انتهای آمینی و توالی‌های هیستیدینی به انتهای کربوکسیلی پروتئین از ویژگی‌های این نوع از وکتورهای pET می‌باشد. این وکتور حاوی پروموتور T7 است. منشای fl برای تولید DNA تک رشته‌ای حاصل از ناحیه همسانه‌سازی - بیان با کمک آلودگی با فاژ کمی تعبیه شده شده است و تعیین توالی تک رشته با استفاده از پرایمر خاتمه T7 امکان پذیر خواهد بود. این ناقل همچنین دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین است و دارای جایگاه‌های برشی متعدد نیز می‌باشد.

برای کلونینگ ژن *Amy1136* در حامل pET-26b(+، ابتدا این حامل را از باکتری حاوی pET-26b(+ که قبلاً درون آن ترانسفورم شده بود، با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و برای بررسی روی ژل آگارز (۱٪) الکتروفورز گردید.

۳-۳-۴ هضم محصول PCR و ناقل

هضم محصول PCR و وکتور با آنزیم‌های *Not I* و *Nde I* که مخلوط واکنش به ترتیب $20\ \mu\text{l}$ ($12\ \mu\text{l}$ محصول PCR، $1\ \mu\text{l}$ آنزیم *Nde I*، $1\ \mu\text{l}$ آنزیم *Not I*، $1\ \mu\text{l}$ بافر Orange، $4\ \mu\text{l}$ آب دیونیزه) و $10\ \mu\text{l}$

(۵ μl وکتور pET-26b(+), ۰/۲ μl آنزیم *Nde* I, ۰/۲ μl آنزیم *Not* I, ۱ μl بافر Orange, ۳/۶ μl آب دیونیزه) در دمای ۳۷ °C به ترتیب به مدت ۳ و ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس هضم محصول PCR و وکتور توسط کیت High Pure PCR Product Purification تخلیص گردیدند و همچنین غلظت DNA توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد. تخلیص محصول PCR برش خورده با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR و با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. همچنین محصول برش حامل pET-26b(+)
پس از الکتروفورز در ژل آگارز (۱٪) و رنگ آمیزی متیلن بلو، قطعه هدف از ژل بریده شد و با کیت تخلیص DNA از ژل و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده ریکاوری گردید.

۳-۳-۵ الحاق محصول PCR در حامل بیانی

با توجه به غلظت وکتور و ژن و با رعایت نسبت ۱ به ۳ مخلوط واکنش به حجم ۲۰ μl (۲ μl وکتور pET-26b(+), ۶ μl ژن *Amy1136*, ۱ μl آنزیم T4 DNA Ligase, ۲ μl بافر لیگاز و ۹ μl آب دیونیزه) در دمای ۱۶ °C به مدت ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ °C به مدت ۱ ساعت انجام گرفت.

۳-۳-۶ تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* BL21 و *E. coli* DH5a

برای تهیه سلول مستعد، ابتدا ۵ ml از محیط باکتری در دمای ۳۷ °C و شیک ۱۸۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. بعد از ۱۶ ساعت از ۱ ml از کشت را به ۱۰۰ ml محیط LB جدید تلقیح کرده و دمای ۳۷ °C و شیک ۱۸۰ rpm قرار داده شد. در $OD_{600} = 0/4$ ، محیط را ۲ قسمت کرده و هر ml ۵۰ را درون یک فالكون ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه درون یخ انکوبه شدند. سپس ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی دور ریخته شد و ۱۰ ml محلول $CaCl_2$ (۱۰۰ mM) ۴ °C رسوبها اضافه گردید (به آرامی روی یخ حل شدند). سپس ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و مانند مرحله قبل به هر کدام از رسوبها ۱۰ ml $CaCl_2$ (۱۰۰ mM) ۴ °C اضافه گردید. محلولها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. سلولها ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته

شد و به هر رسوب ۲ ml CaCl_2 (۱۰۰ mM) به همراه گلیسرول ۱۵٪ اضافه شد و به خوبی سلول‌ها حل شده و در ویال‌های ۱/۵ ml به مقدار ۱۰۰ μl ریخته شدند. و به فریزر $^\circ\text{C} -70$ منتقل شدند. تست زنده مانی، آلودگی و مستعد شدن انجام شد.

۳-۳-۷ انتقال محصول الحاق به میزبان تکثیری

برای انتقال از باکتری *E. coli* DH5 α استفاده شد و از روش شوک حرارتی برای انتقال به باکتری‌های مستعد شده استفاده گردید. برای این منظور ۵ μl از محصول الحاق را به ویال حاوی ۱۰۰ μl سلول مستعد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شد. سپس به منظور شوک حرارتی، ۹۰ ثانیه در دمای $^\circ\text{C} 42$ قرار گرفت و مجدداً ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه، محیط LB (۷۰۰ μl) به ویال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای $^\circ\text{C} 37$ و شیک ۱۸۰ rpm انکوبه گردید. پس از یک ساعت ۵ دقیقه با دور $\times\text{g} 3000$ سانتریفیوژ شد و ۶۰۰ μl از محلول رویی را دور ریخته و رسوب به همراه مابقی محیط مخلوط گردید و سپس روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (با غلظت نهایی ۳۰ mg/ml) کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای $^\circ\text{C} 37$ انکوبه گردید.

۳-۳-۸ استخراج پلاسمید از کلنی‌ها به روش دستی (لیز قلیایی)

ابتدا ۲ میلی لیتر از کشت شبانه باکتری را ۵ دقیقه با دور $\times\text{g} 4000$ سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته، ۲۰۰ μl محلول I (۵۰ mM گلوکز، ۲۵ mM Tris HCl، ۱۰ mM EDTA) به رسوب باکتری افزوده و به آرامی حل گردید به طوریکه محلول یکنواختی به دست آمد. سپس ۴۰۰ μl محلول II (۵ N NaOH، ۱۰٪ SDS، آب دیونیزه) به محلول افزوده و مخلوط شد. ۳۰۰ μl محلول III (۵ M پتاسیم استات، ۵ M استیک اسید) اضافه و مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. ویال حاوی مخلوط ۱۵ دقیقه با دور $\times\text{g} 10000$ در دمای $^\circ\text{C} 4$ سانتریفیوژ شد و محلول رویی به ویال جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد، ۱۵ دقیقه با دور $\times\text{g} 10000$ و دمای $^\circ\text{C} 4$ سانتریفیوژ شد. محلول رویی را دور ریخته، ۱۰۰ μl اتانول ۷۰٪ به رسوب افزوده و ۱۵



دقیقه با دور $10000 \times g$ و دمای $4^\circ C$ سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و اجازه داده تا ویال‌ها کامل خشک شود. پس از خشک شدن ویال، $15 \mu l$ آب دیونیزه به رسوب افزوده و حل گردید و برای بررسی روی ژل آگارز (۱٪) الکتروفورز گردید. و نمونه‌ها برای نگهداری به فریزر $20^\circ C$ - منتقل شدند.

۳-۳-۹ تعیین توالی ژن *Amy1136*

از روش‌های اختلاف حرکت پلاسمید، هضم آنزیمی و تکثیر قطعه‌ی کلون شده جهت تعیین کلونی-های نو ترکیب استفاده شد. در نهایت به منظور تعیین توالی ژن *Amy1136* همسانه سازی شده جهت تایید، سازه *pET-26b(+)-Amy1136* به شرکت 1st BASE Sequencing INT (مالزی) ارسال گردید. تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت عمومی حامل *pET-26b(+)* (T7 Promoter و T7 Terminator) صورت گرفت. پس از تعیین توالی، کیفیت توالی با توجه به ارتفاع امواج ثبتي حاصل با استفاده از نرم افزار FinchTV نسخه 1.4.0 بررسی شد. سپس توالی حاصل با استفاده از نرم افزار آنلاین BLAST در پایگاه داده NCBI به آدرس اینترنتی (www.ncbi.nlm.nih.gov)، با توالی ژن *Amy1136* از باکتری *Cohnella* sp.A01 مقایسه شد. همچنین توالی حاصل با استفاده از نرم افزار آنلاین Translate tool در پایگاه اینترنتی expasy به آدرس اینترنتی (<http://www.expasy.org>)، از نظر قالب خواندن ترجمه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۳-۱۰ انتقال سازه *pET-26b(+)-Amy1136* به میزبان بیانی

پس از تایید نهایی و اطمینان از کلونینگ، حامل نو ترکیب *pET-26b(+)-Amy1136* به روش شوک حرارتی به سلول مستعد *E. coli* BL21 که از قبل تهیه شده با روشی که توضیح آن قبلاً ذکر شد، منتقل گردید. سپس روی پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و در دمای $37^\circ C$ به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

۳-۳-۱۱ بیان Amy1136

پیش کشت شبانه از تک کلون در ۵ ml محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین تهیه شد و در دمای 37°C و شیک ۱۸۰ rpm انکوبه شد. پس از گذشت ۱۶ ساعت، ۱ ml از پیش کشت به ۵۰ ml محیط LB تازه درون ارلن تلقیح و در دمای 37°C و شیک ۱۸۰ rpm انکوبه شد. زمانی که OD محیط در طول موج ۶۰۰ nm به $0/3$ تا $0/8$ رسید ۲ ml از آن به عنوان کنترل منفی برداشته شد و ۱۰ دقیقه با دور $6000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و برای نگهداری به فریزر 20°C - منتقل شد. IPTG $0/5 \text{ mM}$ به عنوان القاگر بیان به محیط افزوده و در دمای 25°C و شیک ۱۵۰ rpm انکوبه شد. بعد از ۱، ۳ و ۶ ساعت نمونه برداری صورت گرفت. رسوب نمونه‌ها همانند کنترل منفی گرفته شد و به فریزر 20°C - منتقل شدند. بعد از گذشت یک شبانه روز از بیان، رسوب باکتری گرفته شد و برای انجام مراحل بعدی در دمای 20°C - نگهداری شد.

۳-۳-۱۲ الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید- سدیم دو دسیل سولفات

قالب ژل با استفاده از اسپیسر روی هم قرار گرفتند. جهت بستن فاصله بین دو شیشه از آگار ۱٪ استفاده گردید. ژل تفکیک کننده^۱ $12/5\%$ (Tris-base $1/5 \text{ M}$) و $0/4\%$ (w/v) SDS، $5/85 \text{ ml}$ محلول Stock 30% (w/v) اکریل آمید و $1/3\%$ (w/v) بیس اکریل آمید، $50 \mu\text{l}$ محلول 10% (w/v) آمونیوم پرسولفات (APS)، روی آن آب مقطر ریخته شد. پس از ۱۰ دقیقه آب درون شیشه‌ها را خالی و ژل متراکم کننده^۲ 4% (Tris-base $0/5 \text{ M}$) و $0/4\%$ (w/v) SDS، 1 ml محلول استوک 30% (w/v) اکریل آمید و $1/3\%$ (w/v) بیس اکریل آمید، $25 \mu\text{l}$ محلول 10% (w/v) آمونیوم پرسولفات (APS)، $25 \mu\text{l}$ محلول 10% (w/v) TEMED را ریخته و بلافاصله شانه^۳ درون آن قرار داده شد. پس از بسته شدن کامل ژل به آرامی شانه خارج شد. برای الکتروفورز پروتئین‌ها، رسوب‌های باکتری در $100 \mu\text{l}$

1. Resolving Gel
2. Stacking Gel
3. Comb

Sample solvent (Tris HCl) (50 mM)، SDS (w/v) ۰.۲٪، گلیسرول، (w/v) ۰.۱٪، مرکاپتواتانول، EDTA (2/5 mM)، (w/v) ۰.۱/۰.۲٪ (بروموفنول بلو)) جهت واسرشت سازی پروتئین‌های موجود در باکتری حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند (جهت شکستن دیواره سلول و آزاد شدن محتویات آن). بعد از جوشاندن، ۱۰ دقیقه با دور $6000 \times g$ سانتریفیوژ شده و ۲۰ μ l از محلول رویی هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از سرنگ هامیلتون درون چاهک‌ها ران شدند. الکتروفورز ژل در بافر تانک (Tris-base) (0/0.24 M)، SDS (w/v) ۰.۱/۰.۱٪، گلیسین (0/19 M) با ولتاژ ۱۲۰ ولت انجام گرفت. پس از پایان الکتروفورز شیشه‌ها از هم جدا و به آرامی ژل از آن خارج گردید. پس از جدا کردن ژل متراکم کننده آن را دور انداخته و ژل تفکیک کننده را درون ظرف حاوی رنگ کوماسی بریلیانت بلو R250 (متانول (v/v) ۰.۹۶٪، اسید استیک (v/v) ۰.۹۶٪، رنگ کوماسی بلو R250) گذاشته و روی شیکر با دور ۳۰ و $22^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از خارج کردن رنگ از ژل، دوبار با آب مقطر شستشو داده شد و به وسیله محلول رنگ بر (متانول (v/v) ۰.۹۶٪، اسید استیک (v/v) ۰.۹۶٪، آب مقطر)، به مدت ۲ ساعت رنگ زدایی گردید. پس از آن ظاهر شدن باندهای پروتئینی، ژل با آب مقطر شسته شد.

۱۳-۳-۳ لیز باکتری‌ها با دستگاه اولتراسونیک

به منظور شکستن دیواره سلول باکتری و خروج پروتئین‌ها از جمله پروتئین Amy1136 به محیط، از دستگاه اولتراسونیک استفاده گردید. به طوریکه رسوب ۵۰ ml از باکتری در ۲ ml Lysis buffer (50 mM Na_2HPO_4 ، 300 mM $NaCl_2$ ، 10 mM ایمیدازول، 0/0.5٪ Tween20) به آرامی حل گردید. سپس ۴۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. بعد از گذشت ۴۵ دقیقه، سونیکاسیون روی یخ با ولتاژ ۹۰ و پالس ۰/۷ در ۷ بازه زمانی (۳۵ ثانیه سونیکیت و ۴۵ ثانیه استراحت) انجام گرفت. بلافاصله به مدت ۴۰ دقیقه با دور $8000 \times g$ در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای مراحل بعدی از جمله خالص سازی به $4^{\circ}C$ منتقل شد.

۳-۳-۱۴ خالص سازی به روش شوک حرارتی

با توجه به این که ژن آنزیم Amy1136 از باکتری ترموفیل جداسازی شده و احتمال می رود در دمای بالا پایدار باشد، به منظور حذف پروتئین های میزبان از محلول رویی حاصل از سونیکاسیون، ۱ ml از محلول حاوی پروتئین به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ °C انکوبه گردید. سپس ۳۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰×g، دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای بررسی مراحل بعدی در دمای ۴ °C قرار گرفت.

۳-۳-۱۵ تعویض بافر آنزیم Amy1136

تعویض بافر به روش دیالیز انجام گرفت. اساس این روش ناشی از خصوصیات غشاهای نیمه تراوا می باشد که مابین محلول پروتئین و بافر دیالیز قرار می گیرد. رخدادهای دیالیز به علت تفاوت در غلظت ترکیبات دو طرف غشاء است و بنابراین هر زمانی که غلظت ترکیبات مزبور در دو طرف غشاء یکسان شوند، تعداد مولکول های مبادله شده از دو سمت غشاء به وضیت توازن می رسند.

به کار بردن غشاهای مستلزم آماده سازی اولیه است تا روزه ها باز شوند. کیسه دیالیز خشک را با دقت به یک بشر یک لیتری انتقال داده و سپس ۲۰۰ ml محلول NaHCO_3 ۱۰۰ mM و EDTA ۱۰ mM (pH = ۷) به آن اضافه نمودیم، به مدت ۱۰-۵ دقیقه جوشانده شد، سپس محلول درون بشر را با آب مقطر تعویض کردیم و به این نحو سه بار عمل شستشو انجام شد. هنگام کار با کیسه دیالیز از دستکش استفاده شد تا از آلودگی با پروتئین ها جلوگیری به عمل بیاید. انتهای کیسه با گره زدن به خوبی مسدود شد. پس از آماده سازی کیسه دیالیز، ۴ ml از آنزیم خالص به کیسه منتقل و درب کیسه با گیره مخصوص محکم شد. سپس کیسه دیالیز حاوی آنزیم، در ظرف حاوی یک لیتر بافر پتاسیم فسفات (۵۰ mM و pH = ۸) قرار داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ °C و روی هم وزن مغناطیسی قرار گرفت. در نهایت آنزیم از کیسه دیالیز خارج گردید.

۳-۳-۱۶- سنجش فعالیت آنزیم

سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از روش توقف واکنش^۱ انجام گرفت. بدین منظور محلول‌های ۱٪ نشاسته و پلوان در بافر پتاسیم فسفات (pH = ۸، ۵۰ mM) تهیه گردید و به عنوان سوسترای آنزیمی استفاده شد. ۲۰ μl نمونه آنزیمی به ۲۰ μl محلول سوسترای اضافه گردید. مخلوط واکنش به همراه شاهد (محلول سوسترای) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ °C انکوبه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه واکنش به وسیله ۱۰۰ μl محلول رنگی ۳ و ۵ دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) (w/v) ۱٪ پودر DNS، ۳۰٪ (w/v) سدیم پتاسیم تارتارات، ۱/۶٪ (w/v) NaOH) واکنش متوقف و ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ °C جوشانده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق جذب در طول موج ۵۳۰nm خوانده شد.

۳-۳-۱۷- سنجش فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی^۲ از منحنی استاندارد مالتوز استفاده گردید. نمودار بر اساس غلظت‌های مختلف مالتوز در طول موج ۵۳۰nm رسم شد. در این راستا، ابتدا ۵ غلظت ۰، ۱۸/۲۵، ۳۶/۵۱، ۷۳/۰۳، ۱۴۶/۰۷ میکرومول از مالتوز تهیه و هم حجم آن (۲۰ μl) محلول DNS اضافه شد. سپس محلول فوق به همراه نمونه‌ی آنزیمی ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از سرد شدن در دمای محیط جذب آن را در طول موج ۵۳۰nm خوانده و منحنی استاندارد آنزیمی رسم گردید. به کمک آن واحد آنزیمی (Unit) محاسبه گردید. یک واحدی آنزیمی مقداری از آنزیم می-باشد که در یک دقیقه یک میکرومول سوسترای مصرف یا یک میکرومول محصول تولید کند و غلظت آنزیم به روش بردفورد^۳ تعیین گردید (Bradford, 1975). برای این آزمایش ابتدا ۱۰۰ mg پودر کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ ml اتانول (v/v) ۹۶٪ حل گردید. سپس ۱۰۰ ml اسید فسفریک (w/v) ۸۵٪ به آن اضافه و حجم محلول به ۱ لیتر رسانده شد. محلول حاصل از صافی رد و به عنوان معرف بردفورد از آن استفاده شد. ابتدا غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱

1. End point
2. Unit
3. Bradford

(mg/ml) پروتئین استاندارد BSA (Bovin Serum Albumin) تهیه و معرف بردفورد به آن‌ها اضافه شد، و غلظت نمونه آنزیمی در طول موج ۵۹۵ و با استفاده از نمودار استاندارد با نرم افزار Excel تعیین شد.

۳-۳-۱۸ طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی تولید و فعالیت Amy1136

۳-۳-۱۸-۱ غربالگری فاکتورها توسط روش پلاکت برمن

این طراحی برای غربالگری فاکتورهایی که اثرات قابل توجهی در تولید و فعالیت آنزیم Amy1136 دارند، استفاده شد. ۶ فاکتور شامل غلظت IPTG، pH محیط، دما، دور چرخش، جمعیت باکتری در زمان تلقیح IPTG و زمان بیان غربال شدند. هر یک از فاکتورها در این طرح آزمایشی در دو سطح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳-۱). به منظور انجام طراحی پلاکت برمن با نرم افزار Minitab 17 استفاده شد.

به منظور شناسایی فاکتورهای مؤثر از بین فاکتورهای مورد غربالگری دوازده آزمایش به صورت تصادفی توسط نرم افزار طراحی شد.

بر اساس نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و با در نظر گرفتن ($\alpha = 0/1$) فاکتورهای مؤثر بر پاسخ شناسایی و برای انجام روش سطح پاسخ مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳-۱۸-۲ بهینه سازی بر اساس طراحی آزمایش به روش آر اس ام

پس از غربالگری فاکتورها توسط طراحی پلاکت برمن و تعیین سه فاکتور مؤثر بر تولید و فعالیت آنزیم Amy1136، طرح مرکب مرکزی به منظور انجام بهینه سازی و برای هر فاکتور در پنج سطح استفاده شد (جدول ۳-۲). به منظور انجام بهینه سازی به روش آر اس ام از نرم افزار Design Expert 7 استفاده شد.

بر اساس طرح مرکب مرکزی ۲۰ آزمایش برای سه فاکتور مؤثر بر پاسخ طراحی شد که شامل شش تکرار در نقطه‌ی مرکزی است.



۳-۳-۱۹ بررسی خصوصیات بیوشیمیایی Amy1136

۳-۳-۱۹-۱ بررسی اثر دما در فعالیت آنزیم

تغییر دما منجر به تغییر در انرژی جنبشی می‌شود بنابراین هر آنزیمی دارای یک دمای بهینه می‌باشد که در آن دما حداکثر فعالیت را دارد. برای تعیین بهترین دما برای حداکثر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت نسبی آن در دماهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد) بررسی گردید. نمودار پروفایل دما با استفاده از نرم افزار Prism رسم گردید.

۳-۳-۱۹-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما

ابتدا نمونه آنزیمی به مدت ۱۲۰ دقیقه در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰، به طور جداگانه قرار گرفت.

همچنین به منظور بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما در زمان، نمونه آنزیمی به مدت ۵ ساعت با فواصل زمانی ۱ ساعت در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سنجش فعالیت آنزیمی برای

جدول ۳-۱: محدوده تغییرات فاکتورها در طراحی

متغیرها	واحد	سطح پایین (-۱)	سطح بالا (+۱)
غلظت IPTG	mM	۰/۱	۱/۲
PH	---	۵/۵	۸
دما	°C	۲۰	۴۰
دور چرخش	rpm	۸۰	۲۰۰
جمعیت باکتری	---	۰/۳	۱/۵
زمان بیان	ساعت	۴	۱۸

جدول ۳-۲: محدوده تغییرات فاکتورها در طراحی سطح پاسخ به روش طرح مرکب مرکزی

متغیرها	واحد	محور پایینی ($-\alpha$)	سطح پایین (-۱)	مرکز (۰)	سطح بالا (+۱)	محور بالایی ($+\alpha$)
دما	$^{\circ}\text{C}$	۱۷	۲۳	۲۹	۳۵	۴۱
دور چرخش	rpm	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰
جمعیت باکتری	---	۰/۴	۰/۷	۱	۱/۳	۱/۶

تمامی نمونه‌ها انجام گرفت؛ به طوری که محلول‌های سوپسترا به نمونه‌های آنزیمی اضافه شد، و به مدت ۵ دقیقه (واکنش آمیلازی) و ۲۰ دقیقه (واکنش پلوانازی) در دمای بهینه، به همراه شاهد (نمونه بدون آنزیم) انکوبه شدند. پس از طی زمان واکنش $20 \mu\text{l}$ محلول DNS به منظور توقف آزمایش اضافه گردید. سپس ۱۰ دقیقه در دمای 100°C درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند، و پس از سرد شدن در دمای محیط جذب نمونه‌ها در طول موج 530 nm خوانده شد، و فعالیت آنزیمی با رسم نمودار توسط نرم افزار Prism بررسی شد.

۳-۳-۱۹-۳ بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم Amy1136

ابتدا بافر ترکیبی 0.05 M (فسفات پتاسیم، استات سدیم، کربنات سدیم و بی‌کربنات سدیم) با pHهای ۴ تا ۱۱ تهیه شد. سپس واکنش سنجش فعالیت آنزیم، در pHهای مختلف و در دمای بهینه فعالیت آنزیم، به همراه شاهد برای هر pH انجام شد (واکنش آنزیمی هم برای سوپسترا نشاسته و هم پلوان انجام گرفت). پس از افزودن تمامی اجزا واکنش، pH نهایی با کاغذ pH متر چک شد.

۳-۳-۱۹-۴ بررسی تاثیر pH بر پایداری آنزیم Amy1136

pHهای ۳ تا ۱۱ در 50 mM بافر ترکیبی (پتاسیم فسفات، سدیم استات و گلیسین) تهیه شد. مقدار $80 \mu\text{l}$ Amy1136 در بافر فسفات پتاسیم 5 mM مولار، به $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر بافر

ترکیبی با pH های مختلف اضافه شد و pH نهایی با کاغذ pH متر چک شد. نمونه‌های آنزیمی به مدت ۲ ساعت در pH های موردنظر قرار گرفتند.

همچنین، به منظور بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH در طول زمان، مقدار ۸۰ میکرولیتر از آنزیم *Amy116* (در بافر پتاسیم فسفات ۵ mM)، به طور جداگانه به مدت ۱ تا ۲۴ ساعت، در ۱۰ μ l بافر ترکیبی (۵۰ mM) با pH های ۳، ۸ و ۱۱ قرار گرفت. سپس، با نمونه‌های آنزیمی، واکنش سنجش فعالیت در دما و pH بهینه فعالیت آنزیم، به همراه شاهد (بدون آنزیم) انجام شد (واکنش فعالیت آنزیم هم برای سوبسترا نشاسته و هم برای سوبسترا پلوان انجام گرفت).

۵-۱۹-۳ بررسی تاثیر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم *Amy1136*

محلول ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار از نمک‌های CaCl_2 ، MgCl_2 ، MnCl_2 ، FeCl_3 ، FeCl_2 ، CuSO_4 ، ZnSO_4 ، LiCl ، KCl ، NaCl ، BaCl_2 ، CoCl_2 و AgNO_3 تهیه شد. مقدار ۱۶ میکرولیتر از *Amy1136* با ۸ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های یونی مخلوط شد. سپس، با نمونه‌های آنزیمی، واکنش سنجش فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به همراه شاهد یعنی نمونه بدون آنزیم (هم برای سوبسترای نشاسته و هم برای سوبسترا پلوان) انجام شد. غلظت نهایی یون‌ها در مخلوط واکنش به ۳ و ۶ میلی‌مولار رسید.

۶-۱۹-۳ بررسی تاثیر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم *Amy1136*

حلال‌های آلی، شامل متانول، اتانول، ایزوپروپانول، ایزوبوتانول، گلیسرول، استون، در واکنش سنجش فعالیت آنزیمی به کار رفت؛ به گونه‌ای که غلظت نهایی حلال‌های آلی در مخلوط واکنش، به ۱ و ۲ درصد (v/v) رسید. واکنش سنجش فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به همراه شاهد یعنی نمونه بدون آنزیم (هم برای سوبسترای نشاسته و هم برای سوبسترا پلوان) انجام شد.

۳-۳-۱۹-۷ بررسی تاثیر دترجنت‌ها بر فعالیت آنزیم Amy1136

سورفاکتانت‌ها، شامل تویین ۲۰، تویین ۸۰ و تریتون X-۱۰۰ در واکنش سنجش فعالیت آنزیمی به کار رفت؛ به طوری که غلظت نهایی سورفاکتانت در مخلوط واکنش، به ۱ و ۲٪ (v/v) رسید. واکنش سنجش فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه به همراه شاهد یعنی نمونه بدون آنزیم (هم برای سوبسترای نشاسته و هم برای سوبسترا پلولان) انجام شد.

۳-۳-۱۹-۸ بررسی تاثیر برخی مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم Amy1136

محلول ۱۰ mM هر یک از ترکیبات شیمیایی شامل یدواستامید (IAM)، گوانیدین هیدروکلرید (GuHCl)، دی تیوتریتول (DTT)، سدیم آزید (NaNO_3)، بتامرکاپتواتانول، اوره، فنیل متیل سولفونیل فلئورید (PMSF)، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) و سدیم دو دسی سولفات (SDS) مقدار ۱۴ میکرولیتر از Amy1136 با ۳ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های فوق مخلوط شد. سپس، با نمونه‌های آنزیمی، واکنش سنجش فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به همراه شاهد یعنی نمونه بدون آنزیم (هم برای سوبسترای نشاسته و هم برای سوبسترا پلولان) انجام شد. غلظت نهایی هر ترکیب شیمیایی در مخلوط واکنش، به ۱ mM رسید.

۳-۳-۲۰ بررسی ارتباط غلظت سوبسترا با سرعت فعالیت آنزیم Amy1136

تأثیر غلظت‌های مختلف سوبسترا (نشاسته و پلولان) بر سرعت واکنش آنزیمی بررسی شد؛ به این صورت که، واکنش سنجش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ (mg/ml) نشاسته و پلولان انجام شد. هر واکنش، کنترل جداگانه‌ای داشت. پس از محاسبه فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی (Unit)، به منظور به دست آوردن ثابت میکائیلیس (K_m) و بیشترین سرعت آنزیم (V_{max})، نمودار میکائیلیس-منتن با استفاده از نرم افزار Prism 6 رسم گردید.

فصل چہارم

نتیجہ

۱-۴ مطالعات بیوانفورماتیک

۱-۴-۱ پیش‌گویی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم Amy1136
پیش‌گویی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم Amy1136 با استفاده از نرم افزار Protparam انجام گرفت. خروجی برنامه نشان داد که آنزیم Amy1136 دارای ۷۲۲ اسید آمینه و وزن مولکولی kDa ۶۱/۱۰، ۷۵/۶۶، pI = ۶/۱۰، ۷۵/۶۶، شاخص ناپایداری ۲۰/۷۹ و ضریب آلیفاتیک ۹۶/۸۹ می‌باشد.

۲-۱-۴ رسم درختچه فیلوژنتیک

به منظور بررسی روابط تکاملی آنزیم Amy1136 با آنزیم‌های آمیلوپولولاناز خانواده‌های GH13 و GH57، درختچه فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA6 رسم شد (شکل ۱-۴).

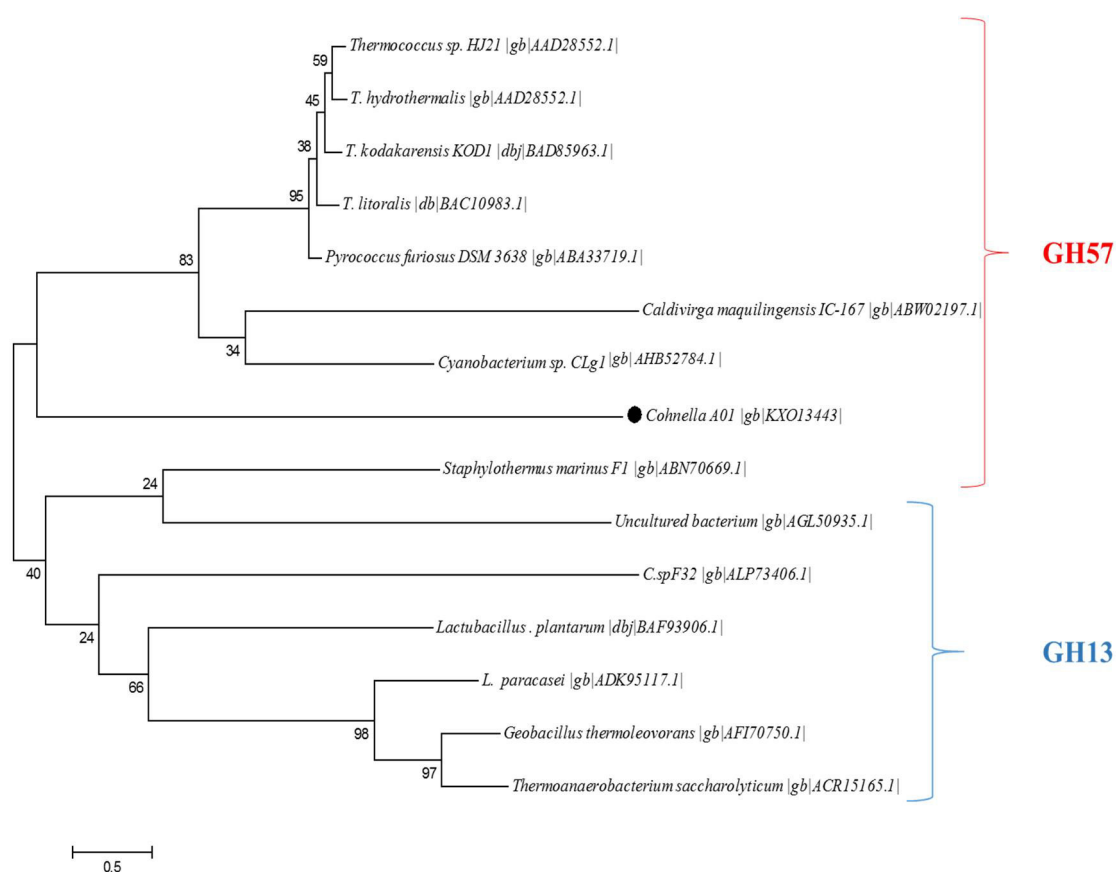
۲-۴ همسانه سازی ژن Amy1136 در ناقل بیانی pET-26b(-)

ژن Amy1136 (۲۱۶۶ جفت باز) باکتری *Cohnella* sp. A01 با استفاده از آنزیم *Pfu* تکثیر شد. باند مورد نظر از باندهای غیر اختصاصی تکثیر شده در واکنش PCR، با استفاده از کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز خالص گردید.

حامل بیانی pET-26b(+) از باکتری *E. coli* DH5 α ، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، استخراج گردید.

واکنش برش آنزیمی حامل بیانی pET-26b(+) با آنزیم‌های *Nde* I و *Not* I انجام گرفت. همچنین هضم محصول PCR نیز به منظور ایجاد انتهای چسبنده در دو سر ژن با آنزیم‌های *Nde* I و *Not* I انجام گرفت. به منظور خالص سازی حامل هضم شده از روی ژل و همچنین خالص سازی ژن Amy1136 هضم شده به ترتیب از کیت تخلیص DNA از روی ژل و تخلیص محصول PCR استفاده گردید.

پس از انجام واکنش اتصالی بین ژن *Amy1136* و حامل بیانی pET-26b(+), مخلوط واکنش، به روش شوک حرارتی، به باکتری *E. coli* DH5 α مستعد، منتقل شد. برای اطمینان از همسانه سازی بررسی اختلاف حرکت روی ژل آگارز با ناقل خالی، PCR با پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی صورت گرفت (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۱: رسم درختچه فیلوژنتیک به منظور بررسی روابط فیلوژنی آنزیم باکتری *Cohnella* sp. A01 با اعضای تولید کننده آنزیم آمیلوپولاناز خانواده های GH57 و GH13 که تعیین خصوصیت شده اند، همانطور که در شکل مشاهده می شود آنزیم این تحقیق در گروه خانواده ۵۷ قرار گرفته می شود. درختچه فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار Mega6.06 با بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد (*C. sp F32* یک آنزیم بتا گلوکاناز بوده و به عنوان یک عضو خارج گروه در رسم درختچه از آن استفاده گردید).

حامل نو ترکیب pET-26b(+)-*Amy1136* برای تایید نهایی و تعیین توالی ژن *Amy1136* به صورت دوطرفه، با آغازگر رفت T7 promoter و آغازگر برگشت T7 terminator و آغازگر میانی (بر اساس توالی میانی ژن)، توالی یابی شد. ژن *Amy1136* با شماره دسترسی kxo13443 در پایگاه داده‌ای Genbank ثبت گردید.

۳-۴ بیان ژن *Amy1136* در میزبان بیانی *E. coli* BL21

حامل pET-26b(+)-*Amy1136* به میزبان بیانی *E. coli* BL21 منتقل، و روی پلیت LB آگار حاوی کانامایسین کشت شد. تست بیان برای یکی از کلنی‌های رشد کرده انجام گرفت. مشاهده باند ۷۵ کیلو دالتونی روی ژل SDS-PAGE بیان ژن *Amy1136* را تایید کرد (شکل ۳-۴).

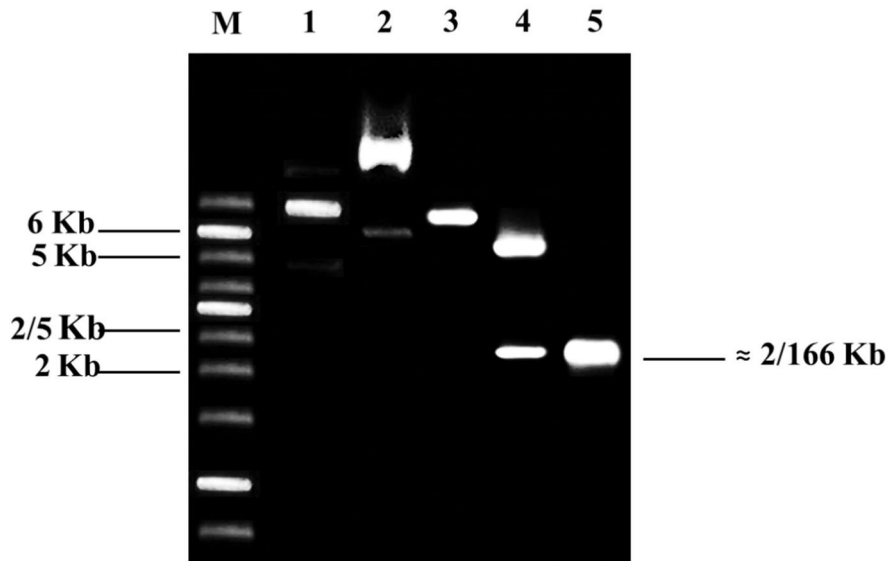
پس از بیان ژن *Amy1136* و انجام سونیکاسیون برای خروج پروتئین از سلول و اطمینان از عدم رسوب آن، سوپ حاصل از سونیکاسیون روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید (شکل ۴-۴ ستون ۱).

محلول پروتئینی حاصل از مرحله سونیکاسیون پس از قرار گرفتن در دمای °C ۹۰ به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ بر روی ژل الکتروفورز بررسی گردید (شکل ۴-۴ ستون ۲). مشاهده تک باند پروتئینی آنزیم *Amy1136* با خلوص بالای ۹۰٪ نشان داد که آنزیم *Amy1136* در دمای بالا پایدار است.

۴-۴ سنجش فعالیت آنزیم *Amy1136*

پس از خالص سازی آنزیم *Amy1136* فعالیت آن بر روی دو سوبسترای نشاسته و پلوان به روش Endpoint بررسی گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که آنزیم *Amy1136* قادر به فعالیت بر روی هر دو سوبسترا نشاسته و پلوان می‌باشد.

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیم بر حسب واحد از منحنی استاندارد مالتوز استفاده گردید. نمودار استاندارد محصول بر اساس غلظت‌های مختلف مالتوز در طول موج ۵۳۰nm با نرم افزار Excel رسم گردید (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۲: همسانه‌سازی ژن *Amy1136* در حامل بیانی (M pET-26b(+)) نشان‌گر وزن مولکولی DNA (۱) حامل pET-26(+).
 (۲) حامل نوترکیب pET-26b(+)-*Amy1136* (۳) حامل نوترکیب pET-26b(+)-*Amy1136* برش خورده با آنزیم *Nde* I
 (۴) برش آنزیمی حامل نوترکیب pET-26b(+)-*Amy1136* با آنزیم‌های *Nde* I و *Not* I و خروج ژن *Amy1136* (۵) محصول
 PCR ژن *Amy1136* در حامل نوترکیب pET-26b(+)-*Amy1136*

۴-۵ بهینه سازی تولید و فعالیت آنزیم Amy1136

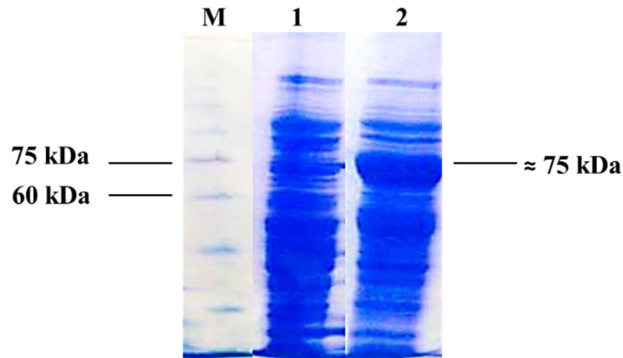
برای بهینه‌سازی عملکرد Amy1136 آزمایش غربالگری انجام گرفت، فاکتورهای اثرگذار مرحله‌ی غربالگری بهینه‌سازی شد و با نتایج به‌دست آمده آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل فرآیند بهینه‌سازی انجام گرفت. در نهایت شرایط بهینه تولید و عملکرد Amy1136 تعیین گردید. نتایج به ترتیب در ذیل شرح داده شده است.

۴-۵-۱ تعیین فاکتورهای موثر بر تولید و فعالیت آنزیم Amy1136

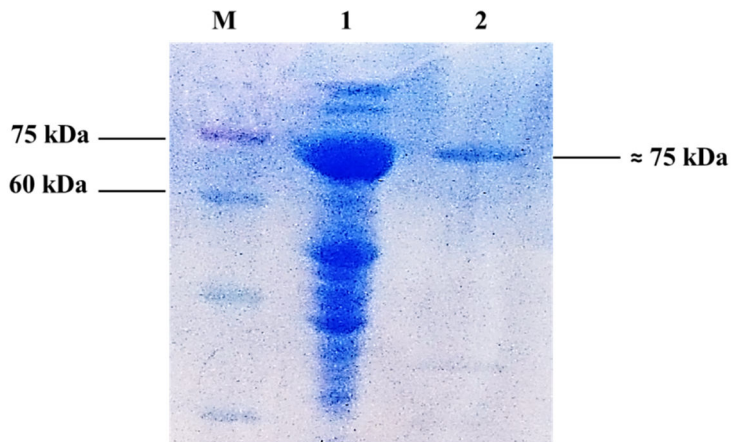
غربالگری ۶ فاکتور (pH (۸ و ۵/۵)، دما (۴۰ و ۲۰°C)، غلظت IPTG (۱/۲ و ۰/۱ mM)، دور چرخ (۲۰۰ rpm و ۸۰)، جمعیت باکتری (OD) (۱/۵ و ۰/۳)، زمان بیان (۱۸ h و ۴) دخیل در تولید و فعالیت آنزیم Amy1136 انجام شد و منجر به انتخاب سه فاکتور اثرگذارتر شد.

برای شناسایی فاکتورهای موثر بر تولید و فعالیت آنزیم Amy1136، دوازده آزمایش به‌صورت تصادفی انجام شد. پس از وارد کردن نتایج آزمایش‌های طراحی‌شده توسط برنامه Plackett-Burman (جدول ۴-۱) خروجی این نرم افزار اثرگذارترین فاکتورها را بر فرآیند تولید و فعالیت معرفی نمود. در شکل ۳-۹ اثرات ۶ فاکتور دخیل در فرآیند تولید و فعالیت آنزیم Amy1136 مورد بررسی قرار گرفت، و به ترتیب سه فاکتور دما، دور چرخش و میزان تلقیح محیط کشت واکنش، فاکتورهای موثر بودند.

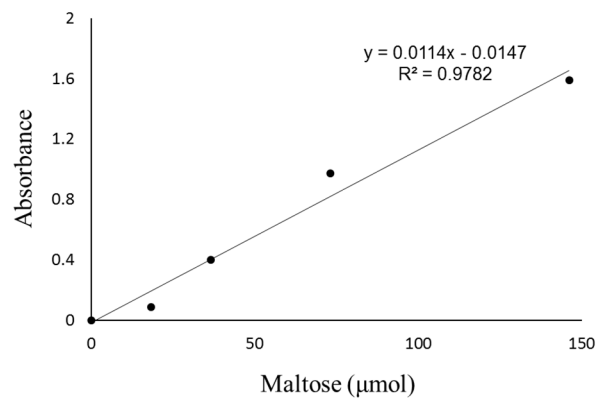
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از مقدار $(\alpha=0/1)$ استفاده شد (جدول ۴-۲). بر اساس خروجی برنامه و بررسی آماری نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها به ترتیب سه فاکتور دما، دور چرخش و میزان تلقیح، بیشترین تأثیر را در فرآیند تولید و فعالیت آنزیم Amy1136 داشتند و به‌عنوان فاکتورهای مؤثر برای انجام طرح آزمایش RSM به کار گرفته شدند.



شکل ۳-۴: الکتروفورز SDS-PAGE برای بررسی بیان ژن *Amy1136* (M) نشان گر وزن مولکولی پروتئین (۱) بیان قبل از القای IPTG (کنترل منفی) (۲) بیان آنزیم *Amy1136* پس از القای IPTG



شکل ۴-۴: الکتروفورز SDS-PAGE بعد از سونیکاسیون سلول باکتری *E. coli* BL21 و خالص سازی آنزیم *Amy1136* (M) نشان گر وزن مولکولی DNA (۱) محلول پروتئینی حاصل از سونیکاسیون (۲) *Amy1136* خالص شده.

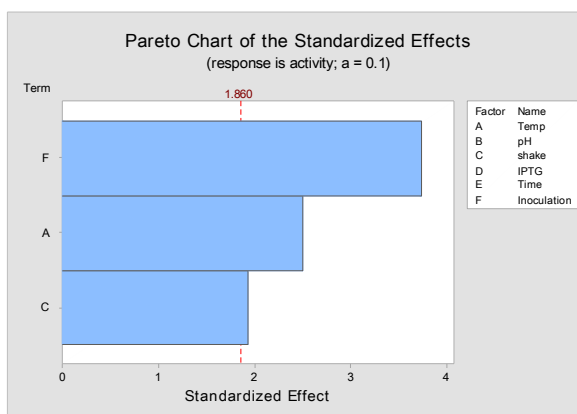


شکل ۵-۴: منحنی استاندارد مالتوز

جدول ۴-۱: نتایج آزمایش‌های طراحی شده توسط برنامه Plackett-Burman

Run Order	Variables						Response
	A	B	C	D	E	F	(Activity (Unit))
۱	+	-	-	-	+	+	۴/۹
۲	+	+	+	-	+	+	۴/۶
۳	-	+	+	+	-	+	۷/۲
۴	-	+	+	-	+	-	۳/۴
۵	+	-	+	-	-	-	۳
۶	+	+	-	+	+	-	۳/۱
۷	+	-	+	+	-	+	۵/۲
۸	-	-	-	+	+	+	۴/۶
۹	-	-	+	+	+	-	۵/۴
۱۰	-	+	-	-	-	+	۵/۴
۱۱	-	-	-	-	-	-	۳/۵
۱۲	+	+	-	+	-	-	۳/۵

(A) دما ۲۰ (-)، ۴۰ (+) pH (B) ۵/۵ (-)، ۸ (+) شیک (C) ۸ (+)، ۵/۵ (-) IPTG (D) ۰/۱ (-)، ۱/۲ (+) (E) زمان ۴h (-)، ۱۸h (+) (F) جمعیت باکتری ۰/۳ (-)، ۱/۵ (+)



شکل ۴-۶: نمودار پارتو خروجی برنامه Plackett-Burman به منظور یافتن فاکتورهای اثرگذار بر فرآیند تولید و



فعالیت آنزیم Amy1136، همانطور که مشاهده می‌شود ۳ فاکتور جمعیت باکتری، دما و دور چرخش فاکتورهای تاثیرگذار شناخته شدند.

جدول ۴-۲: نتایج آنالیز واریانس خروجی برنامه Plackett-Burman

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	۳	۱۱/۸۴۲	۳/۹۴۷۵	۸/۰۰	۰/۰۰۹
Linear	۳	۱۱/۸۴۲	۳/۹۴۷۵	۸/۰۰	۰/۰۰۹
Temperature	۱	۳/۱۰۱	۳/۱۰۰۸	۶/۲۹	۰/۰۳۷
Shake	۱	۱/۸۴۱	۱/۸۴۰۸	۳/۷۳	۰/۰۸۹
Inoculation	۱	۶/۹۰۱	۶/۹۰۰۸	۱۳/۹۹	۰/۰۰۶
Error	۸	۳/۹۴۷	۰/۴۹۳۳		

۴-۵-۲ بهینه سازی با طراحی آزمایش به روش RSM

۴-۵-۲-۱ تجزیه آماری

طراحی آزمایش تعیین میزان اثر سه فاکتور دما، دور چرخش و جمعیت باکتری بر پاسخ بهینه توسط نرم افزار Design Expert 7 و در پنج سطح انجام شد. ۲۰ آزمایش توسط این نرم افزار طراحی و انجام گردید. فعالیت آنزیم Amy1136 بر حسب واحد آنزیمی (Unit) به عنوان پاسخ محاسبه شد (جدول ۴-۳). پس از وارد کردن داده‌ها، پاسخ فرآیند مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از آنالیز واریانس، مناسبترین مدل از بین مدل‌ها به داده‌ها انتخاب شد. با توجه به مدل‌های موجود، مدل‌های درجه دوم بهترین انتخاب را با پاسخ‌های آزمایش نشان دادند.

تحلیل واریانس داده‌ها (جدول ۴-۴) نشان می‌دهد که مدل ارائه شده (رابطه ۴-۱) با ۹۵٪ اطمینان

دارای اثر معنی دار است (در رابطه مذکور، x_1 : دما، x_2 : دور چرخش، x_3 : جمعیت باکتری می‌باشند).

$$R1 = -34.37680 + 1.49400 \times x_1 + 0.14086 \times x_2 + 16.04419 \times x_3 - 1.91667E-003 \times x_1 \times x_2 -$$

$$0.18056 \times x_1 \times x_3 + 0.018333 \times x_2 \times x_3 - 0.017330 \times x_1^2 - 3.14545E-004 \times x_2^2 - 5.82071$$

رابطه ۴-۱

جدول ۳-۴: نتایج آزمایش‌های طراحی شده به روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی

Std.Order	Temperature (°C)	Shake (rpm)	Inoculation	Response
۱	۲۳	۱۰۰	۰/۷	۴/۷
۲	۳۵	۱۰۰	۰/۷	۶
۳	۲۳	۲۰۰	۰/۷	۵/۴
۴	۳۵	۲۰۰	۰/۷	۵/۷
۵	۲۳	۱۰۰	۱/۳	۵/۲
۶	۳۵	۱۰۰	۱/۳	۶/۵
۷	۲۳	۲۰۰	۱/۳	۸/۳
۸	۳۵	۲۰۰	۱/۳	۶
۹	۱۷	۱۵۰	۱	۴/۹
۱۰	۴۱	۱۵۰	۱	۵/۶
۱۱	۲۹	۵۰	۱	۳/۵
۱۲	۲۹	۲۵۰	۱	۵/۷
۱۳	۲۹	۱۵۰	۰/۴	۴/۴
۱۴	۲۹	۱۵۰	۱/۶	۶/۹
۱۵	۲۹	۱۵۰	۱	۷/۸
۱۶	۲۹	۱۵۰	۱	۸/۱
۱۷	۲۹	۱۵۰	۱	۷/۳
۱۸	۲۹	۱۵۰	۱	۸
۱۹	۲۹	۱۵۰	۱	۷/۹
۲۰	۲۹	۱۵۰	۱	۷/۷

جدول ۴-۴: تحلیل واریانس داده‌ها برای پاسخ میزان بیان و فعالیت Amy1136 به روش سطح پاسخ

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Value	P-Value Prob >F
Model	۳۶/۱۲	۹	۴/۰۱	۲۵/۹۷	>۰/۰۰۰۱
Residual	۱/۵۵	۱۰	۰/۱۵		

به منظور بررسی حقیقی یا تصادفی بودن همبستگی به دست آمده بین متغیرها باید معنی‌دار بودن همبستگی مدل را مورد آزمون قرار داد. بررسی همبستگی متغیرها به کمک مقدار P ارائه شده برای مدل امکان‌پذیر است. در مقادیر کمتر از ۰/۰۵ برای P، فرض عدم همبستگی معنی‌دار از بین می‌رود. علاوه بر تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقدار P ارائه شده برای مدل، از ضریب تبیین^۱ نیز برای بررسی مدل استفاده می‌شود. مقادیر R^2 نزدیک یک نشان دهنده‌ی انتخاب مناسب مدل ارائه شده و داده‌های آزمایش و تطبیق داده‌های آزمایش با منحنی برازش شده است. نتایج آنالیز واریانس مدل میزان فعالیت بر حسب واحد آنزیمی Amy1136، نشانگر این است که کمتر از ۰/۰۱ درصد احتمال دارد که معنی‌دار بودن مدل ناشی از اختلال و خطا باشد. مقدار ضریب تبیین برای پاسخ میزان فعالیت آنزیم Amy1136 ۰/۹۵۹۰ مناسب است. هرچه مقدار ضریب تبیین به یک نزدیک‌تر شود قدرت مدل انتخاب شده در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر است. چنین عنوان می‌شود که برای مدلی با انتخاب خوب، مقدار ضریب تبیین حداقل باید ۰/۷ باشد. نتایج نشان می‌دهد که ضریب تبیین پیش‌بینی شده^۲ و ضریب تبیین واقعی^۳ متناسب است. دقت مناسب^۴ نیز بیانگر نسبت سیگنال به اختلال است و مقدار مطلوب آن وقتی است که بزرگ‌تر از ۴ باشد. در این تحقیق، این کمیت برابر ۱۵/۱۹۴ و مناسب است (جدول ۴-۵).

1. Regression Coefficient (R-Squared or R^2)
2. Predicted R-Squared
3. Adjusted R-Squared
4. Adeq-Precision

علاوه بر معنی دار بودن کل مدل، معنی داری ضرایب متغیرهای مستقل نیز باید مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به مقادیر P هر یک از عواملها و برهمکنش مابین آنها، می توان عامل های دارای اثر معنی دار را شناسایی کرد.

$P < 0.05$ نشان دهنده اهمیت عامل های مورد بررسی است (جدول ۴-۶). بر اساس نتایج به دست آمده در مسیر فعالیت Amy1136 دو فاکتور دما و دور چرخش باهم دارای برهمکنشاتی هستند که با استفاده از کانتورهای به دست آمده بررسی شدند.

درصد نرمالیتی برحسب داده های واقعی آزمایش توسط مدل رسم شد، این نمودار بیانگر توزیع نرمال داده های آزمایش است و هر قدر پراکندگی داده ها حول خط وسط نمودار بیشتر باشد دارای نرمالیتی بالاتری است و در نتیجه داده ها برای آزمایش قابل اطمینان تر است (شکل ۴-۷). در نمودار مقایسه مقادیر حقیقی و پیش بینی شده برای میزان فعالیت Amy1136، پراکنش داده ها از الگوی خاصی پیروی نمی کند و داده ها در محدوده مجاز قرار گرفته اند. این نمودار بیانگر برازش نسبتا مناسب مدل با داده های آزمایش است و داده ها برای آزمایش قابل اطمینان است (شکل ۴-۸).

۴-۵-۲ تجزیه و تحلیل فرآیند بهینه سازی

- بررسی اثر دما و دور چرخش

بررسی آماری واریانس داده ها (ANOVA جدول) نشان داد که بیشترین میزان برهمکنش در مورد دو فاکتور دما و دور چرخش رخ می دهد، به طوری که در دمای پایین و کاهش دور چرخش و همچنین افزایش زیاد دما و دور چرخش منجر به کاهش میزان پاسخ (فعالیت Amy1136) می شود، و دمای میانه و میزان میانه دور چرخش منجر به افزایش میزان پاسخ می شود (شکل های ۴-۹ و ۴-۱۰).

جدول ۴-۵: مقادیر ضرایب تبیین برای میزان بیان و فعالیت آنزیم Amy1136 به روش سطح پاسخ

Source	Quadratic
--------	-----------



R-Squared	۰/۹۵۹۰
Adj R-Squared	۰/۹۲۲۰
Pred R-Squared	۰/۷۶۴۶
Adeq Precision	۱۵/۱۹۴

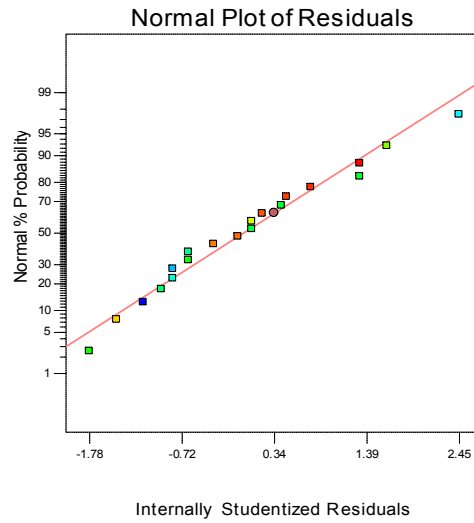
جدول ۴-۶: اثر فاکتورها بر میزان بیان و فعالیت آنزیم Amy1136 به روش سطح پاسخ

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Value	P-Value Prob >F
x ₁	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۱/۶۲	۰/۲۳۲۲
x ₂	۳/۴۲	۱	۳/۴۲	۲۲/۱۴	۰/۰۰۰۸
x ₃	۵/۲۹	۱	۵/۲۹	۳۴/۲۲	۰/۰۰۰۲
x ₁ x ₂	۲/۶۴	۱	۲/۶۴	۱۷۷/۱۱	۰/۰۰۲۰
x ₁ x ₃	۰/۸۴	۱	۰/۸۴	۵/۴۷	۰/۰۴۱۵
x ₂ x ₃	۰/۶۱	۱	۰/۶۱	۳/۹۱	۰/۰۷۶۱
x ₁ ²	۹/۷۹	۱	۹/۷۹	۶۳/۳۱	<۰/۰۰۰۱
x ₂ ²	۱۵/۵۵	۱	۱۵/۵۵	۱۰۰/۵۹	<۰/۰۰۰۱
x ₃ ²	۶/۹۰	۱	۶/۹۰	۴۴/۶۴	<۰/۰۰۰۱
Lack of Fit	۱/۱۵	۵	۰/۲۳	۲/۸۶	۰/۱۳۶۴
Pure Error	۰/۴۰	۵	۰/۰۸۰		
Cor Total	۳۷/۶۷	۱۹			

x₁: دما، x₂: دور چرخش، x₃: جمعیت باکتری می‌باشند.

Design-Expert® Software
R1

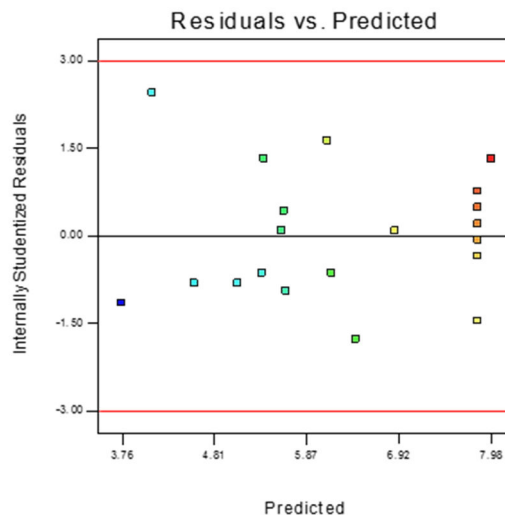
Color points by value of
R1:
8.3
3.5



شکل ۴-۷: نمودار توزیع نرمال داده‌ها. این نمودار نمایانگر توزیع یکنواخت نتایج آزمایش انجام شده است و بیانگر این است که خطاهای احتمالی تاثیری بر نتیجه نهایی ندارد.

Design-Expert® Software
R1

Color points by value of
R1:
8.3
3.5



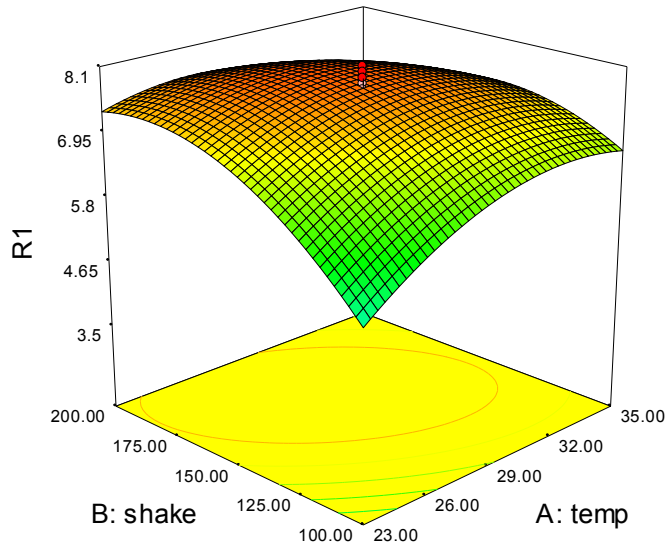
شکل ۴-۸: نمودار مقایسه مقادیر حقیقی و پیش‌بینی شده برای میزان فعالیت آنزیم Amyl136، بر اساس این مدل می‌توان گفت: نتایج حاصل از آزمایش با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم افزار مطابقت داشته و در محدوده تعریف شده توسط نرم افزار می‌باشد.

Design-Expert® Software



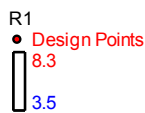
X1 = A: temp
X2 = B: shake

Actual Factor
C: inoculation = 1.00



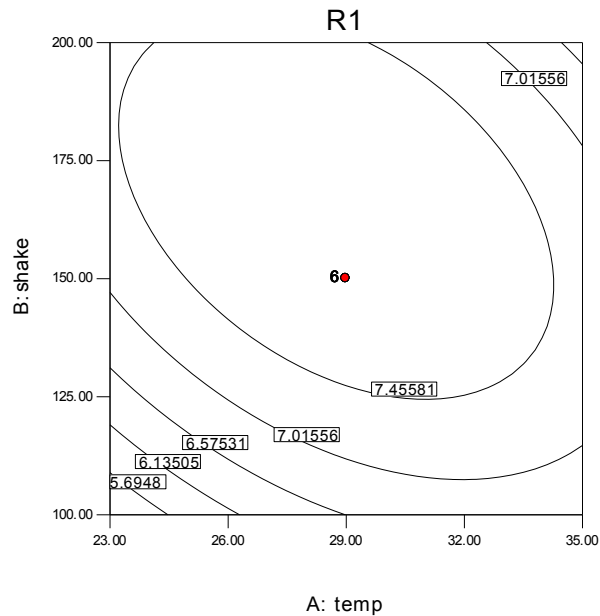
شکل ۴-۹: نمودار سطح پاسخ اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت آنزیم Amy1136، تاثیر متقابل دما و دور چرخش بر میزان فعالیت کاملاً مشخص است؛ به طوری که بیشترین میزان تجزیه در دمای و دور چرخش میانه می باشد.

Design-Expert® Software



X1 = A: temp
X2 = B: shake

Actual Factor
C: inoculation = 1.00



شکل ۴-۱۰: نمودار کانتور اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت آنزیم Amy1136، در این نمودار محور افقی و عمودی، فاکتورهای تاثیرگذار و رنگ نمودار میزان فعالیت آنزیم است که رنگ‌های متمایل به قرمز میزان فعالیت بالاتر را نشان می دهد.

- بررسی اثر دما و جمعیت باکتری

پس از تاثیر متقابل دما و دور چرخش بر میزان فعالیت آنزیم Amy1136، بررسی آماری واریانس داده‌ها (جدول ANOVA) نشان داد که برهمکنش در مورد دو فاکتور دما و جمعیت باکتری نیز رخ می‌دهد، به طوری که در دمای و جمعیت باکتری میانه بیشترین میزان پاسخ رخ می‌دهد (شکل‌های ۴-۱۱ و ۴-۱۲).

۴-۲-۳-۵-۴ بهینه سازی عامل‌های فرآیند

شرایط بهینه پیشنهادی توسط نرم‌افزار، دما: $26/7^{\circ}\text{C}$ ، دور چرخش: ۱۷۹ rpm، جمعیت باکتری: ۱/۲۵ و مقادیر پیش‌بینی شده در شرایط بهینه، R1 (فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی): ۸/۱۷، محدوده پایین پاسخ با اطمینان ۰/۹۵: ۳/۵، محدوده بالای پاسخ با اطمینان ۰/۹۵: ۸/۳ و میزان مطلوبیت بر این پاسخ: ۰/۹۷۳ می‌باشد.

۴-۶ بررسی تاثیر دما بر فعالیت Amy1136

فعالیت آنزیم در دماهای ۱۰ تا 90°C با سه بار تکرار روی دو سوبسترای نشاسته و پلوان اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۳). نتایج نشان داد که، بهینه فعالیت آنزیم در دمای 50°C است، آنزیم در دماهای ۳۰ تا 70°C بر روی سوبسترا نشاسته، و دماهای ۳۰ تا 90°C بر روی سوبسترای پلوان فعالیت بالای ۵۰٪ دارند، و فعالیت بر روی پلوان در تمامی دماها بیشتر از نشاسته است و در دماهای بالای 50°C این اختلاف معنادار است.

۴-۷ بررسی تاثیر دما بر پایداری آنزیم Amy1136

پایداری آنزیم Amy1136 در دماهای ۱۰ تا 90°C در مدت ۲ ساعت با سه بار تکرار روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۴). نتایج نشان داد که آنزیم بعد از مدت ۲ ساعت در دمای 10°C ، ۱۰۰٪ در دماهای 20°C حدود ۹۰٪ در دمای 30°C ، ۷۰٪ در دماهای 40°C تا 60°C حدود ۸۰٪ در دماهای ۷۰ تا 90°C فعالیت آنزیم بر روی سوبسترای نشاسته حفظ شد.

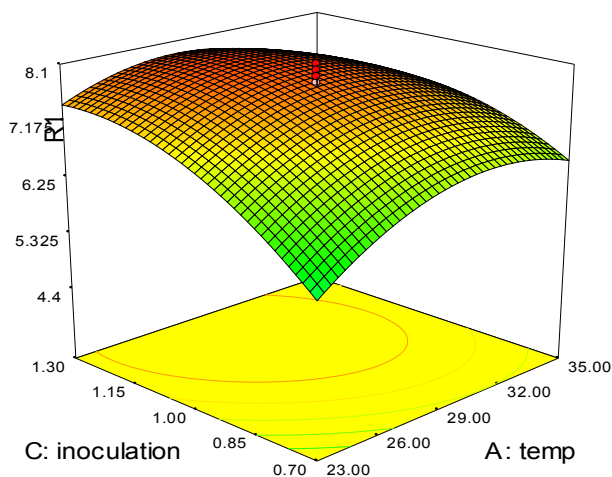
همچنین فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا پلوان پس از ۲ ساعت در دماهای ۱۰ تا ۵۰ °C تقریباً ۱۰۰٪ در دمای ۶۰ °C تا ۹۰٪ در دماهای ۷۰ و ۸۰ °C بالای ۸۰٪ و در دمای ۹۰ °C بالای ۷۵٪ حفظ شد.

Design-Expert® Software

R1
8.3
3.5

X1 = A: temp
X2 = C: inoculation

Actual Factor
B: shake = 150.00



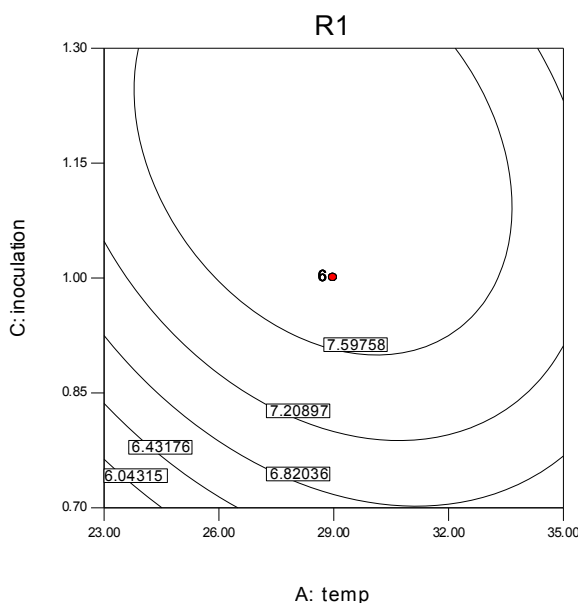
شکل ۴-۱۱: نمودار سطح پاسخ اثر تغییر فاکتورهای دما و جمعیت باکتری بر میزان فعالیت Amy1136. همان‌طور که مشخص است بیشترین میزان تجزیه در دمای و جمعیت باکتری میانه می‌باشد.

Design-Expert® Software

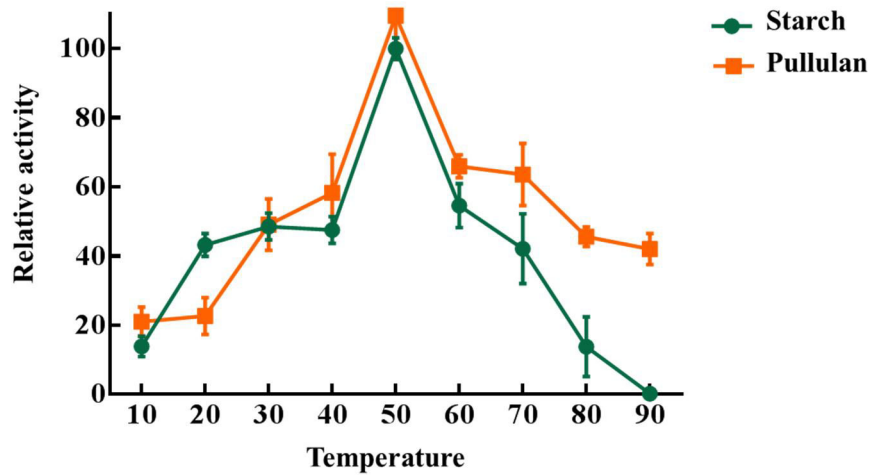
R1
● Design Points
8.3
3.5

X1 = A: temp
X2 = C: inoculation

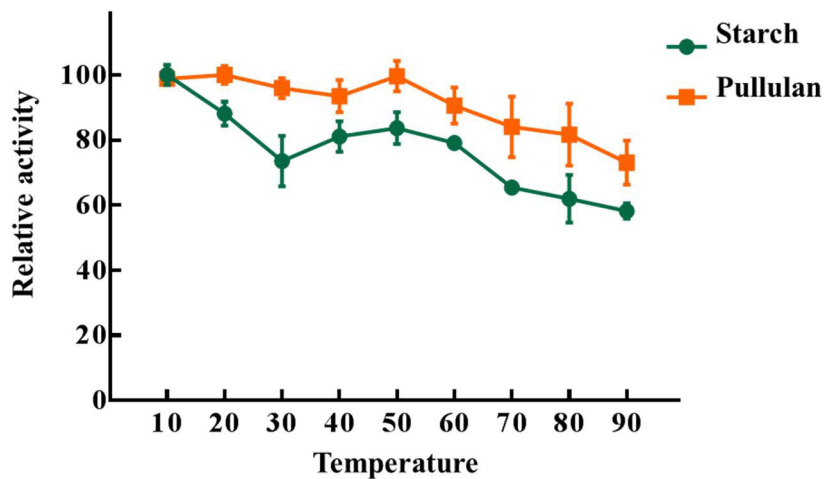
Actual Factor
B: shake = 150.00



شکل ۴-۱۲: نمودار کانتور اثر تغییر فاکتورهای دما و دور چرخش بر میزان فعالیت Amy1136. همان‌طور که مشخص است بیشترین میزان تجزیه در دمای و جمعیت باکتری میانه می‌باشد.



شکل ۴-۱۳: تعیین دمای مناسب بر فعالیت Amyl1136، در دمای ۹۰-۱۰ درجه سانتی گراد در حضور دو سوبسترای نشاسته (Starch) و پلولان (Pullulan) و $\text{pH} = 8$ با ۳ بار تکرار اندازه گیری شد.



شکل ۴-۱۴: پایداری دمای Amyl1136 در دماهای مختلف، فعالیت Amyl1136 بعد از قرار گرفتن آنزیم در دماهای ۹۰-۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت، در دمای 50°C و $\text{pH} = 8$ در حضور سوبسترای نشاسته و پلولان با ۳ بار تکرار اندازه گیری شد.

پایداری آنزیم Amy1136 در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد در طول مدت ۵ ساعت با سه بار تکرار روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۵). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم با گذشت زمان در دمای ۵۰ °C بر روی سوبسترا نشاسته افزایش پیدا کرد و پس از ۱ و ۲ ساعت قرارگیری آنزیم در دمای ۷۰ °C فعالیت آنزیم بر روی سوبسترای نشاسته افزایش پیدا کرد و پس از ۳ و ۴ ساعت فعالیت کمتر شد ولی همچنان فعالیت ۱۰۰ درصدی حفظ شد. ۵۰٪ فعالیت آنزیم پس از ۴ ساعت قرارگیری در دمای ۹۰ °C بر روی سوبسترا نشاسته حفظ شد.

۴-۸ بررسی تاثیر pH بر فعالیت Amy1136

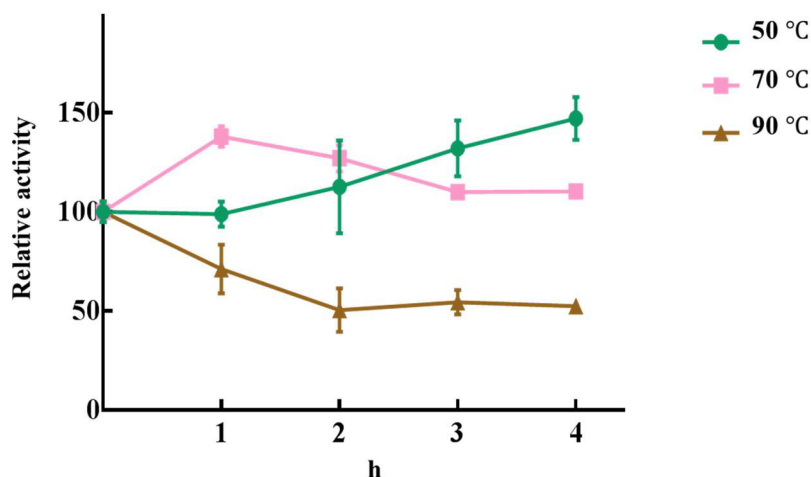
اثر pHهای ۴ تا ۱۱ بر فعالیت Amy1136 در دمای بهینه فعالیت (۵۰ °C) با سه بار تکرار بر روی دو سوبسترای نشاسته و پلوان اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۶). نتایج نشان داد که بهینه فعالیت آنزیم در pH = ۸ (هم فعالیت آمیلازی و هم فعالیت پلواناز) می‌باشد. آنزیم در pHهای ۵ تا ۱۱ و ۷ تا ۱۱ فعالیت خوبی به ترتیب بر روی سوبسترای نشاسته و پلوان از خود نشان داد.

۴-۹ بررسی تاثیر pH بر پایداری Amy1136

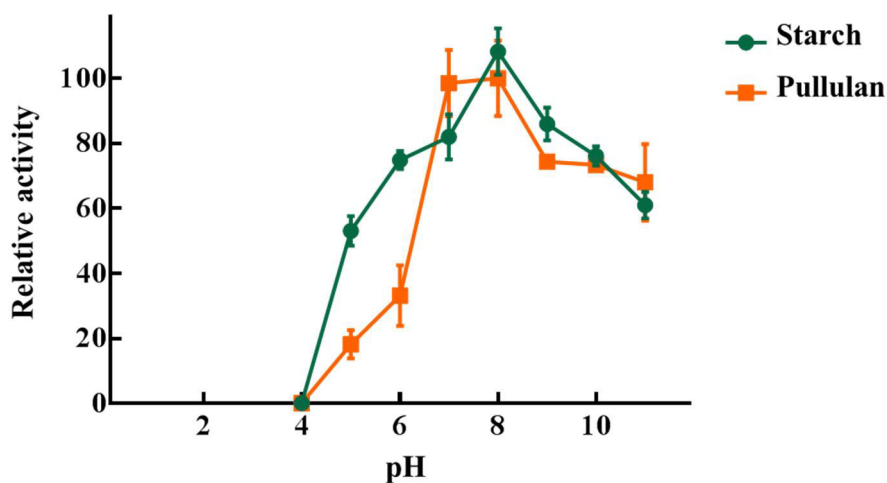
Amy1136 مدت ۲ ساعت در pHهای ۴ تا ۱۱ قرار گرفت. فعالیت باقی مانده آن در شرایط بهینه فعالیت با ۳ بار تکرار بر روی دو سوبسترای نشاسته و پلوان اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۷). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پس از ۲ ساعت قرارگیری در pHهای ۴ تا ۷ بیش از ۵۰٪، pH = ۸ ۱۰۰٪، pHهای ۹ تا ۱۱ حدود ۸۰٪ بر روی سوبسترای نشاسته حفظ شد. فعالیت آنزیم پس از ۲ ساعت قرارگیری در pH = ۴ ۲۰٪، pHهای ۵ و ۶ حدود ۶۰٪، pHهای ۷ تا ۹ بالای ۹۰٪، pHهای ۱۰ و ۱۱ حدود ۵۰٪ بر روی سوبسترای پلوان حفظ شد.

آنزیم به مدت ۲۴ ساعت در pHهای ۴، ۸ و ۱۱ قرار گرفت و در ۱، ۲، ۳، ۲۴ و ۲۴ ساعت انکوباسیون فعالیت باقی مانده آنزیم بر روی دو سوبسترای نشاسته با سه تکرار اندازه‌گیری شد (شکل ۴-۱۸).

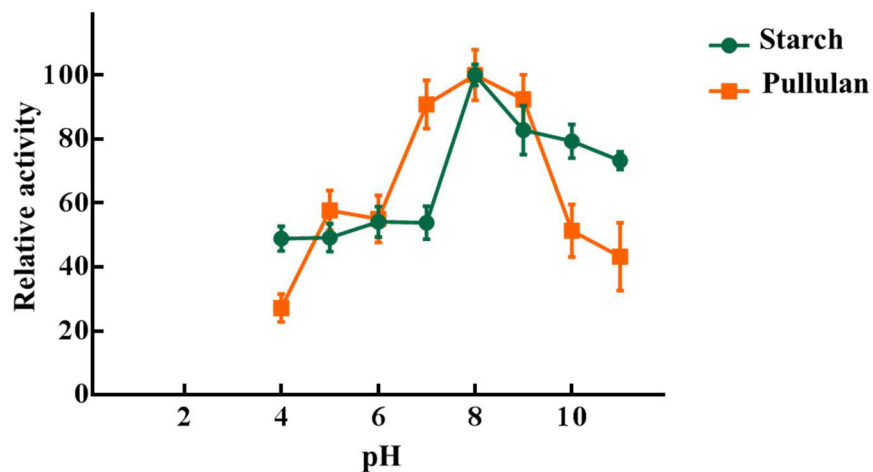
نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پس از گذشت ۲۴ ساعت در pH های ۴، ۸ و ۱۱ به ترتیب تا ۴۰، ۱۰۰ و ۶۰٪ فعالیت حفظ شد.



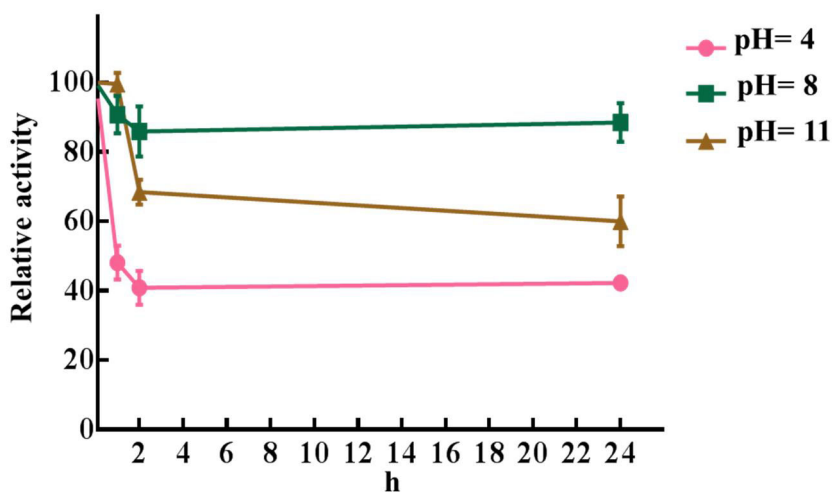
شکل ۴-۱۵: پایداری Amy1136 در دما در زمان‌های مختلف، آنزیم Amy1136 در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. فعالیت آنزیم تا ۴ ساعت در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ در حضور سوبسترا نشاسته اندازه‌گیری شد.



شکل ۴-۱۶: تعیین مناسب pH فعالیت Amy1136، در pH ۴-۱۱ در حضور دو سوبسترای نشاسته و پولولان (۵۰ °C و ۳ تکرار) اندازه‌گیری شد.



شکل ۴-۱۷: پایداری Amy136 به مدت ۲ ساعت در pH های ۳ تا ۱۰، فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ با سه بار تکرار اندازه گیری گردید.



شکل ۴-۱۸: پایداری Amy136 در pH در زمان های مختلف، Amy136 در pH های ۴، ۸ و ۱۱ قرار داده شد. فعالیت آنزیم تا ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ در حضور نشاسته اندازه گیری شد.

۴-۱۰ بررسی تاثیر یون‌های فلزی بر فعالیت Amy1136

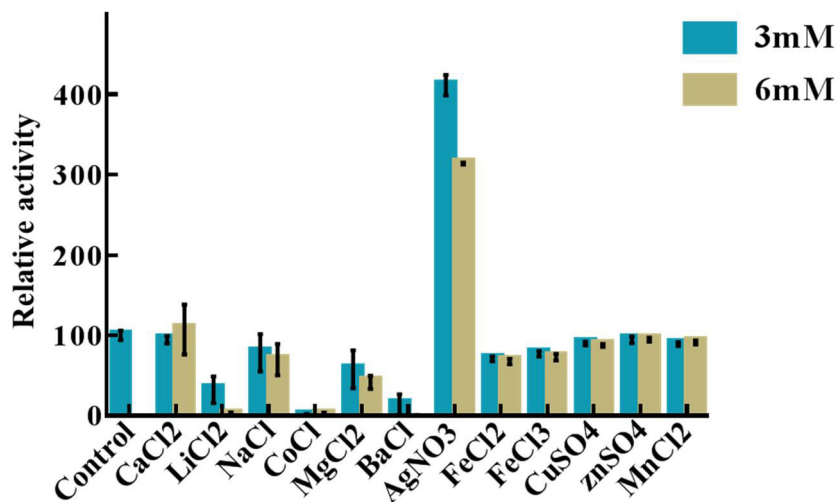
تاثیر غلظت‌های ۳ و ۶ میلی مولار یون‌های $MgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $LiCl$, KCl , $NaCl$, $BaCl_2$ بر روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان با سه تکرار اندازه گیری شد (شکل‌های ۴-۱۹ و ۴-۲۰). یون‌های $CaCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ و $MnCl_2$ تقریباً تاثیری بر فعالیت آنزیم در هر دو غلظت ۳ و ۶ میلی مولار بر روی سوبسترا نشاسته نداشتند. یون $CoCl_2$ در هر دو غلظت، یون‌های $LiCl$ و $BaCl_2$ در غلظت ۶ میلی مولار مانع فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا نشاسته شده و فعالیت به صفر رسید. یون $NaCl$ در غلظت ۳ و ۶ میلی مولار به ترتیب موجب کاهش ۲۲ و ۳۰٪، یون $MgCl_2$ در غلظت ۳ و ۶ میلی مولار به ترتیب موجب کاهش ۴۲ و ۵۸٪، یون‌های $FeCl_2$ و $FeCl_3$ در هر دو غلظت ۳ و ۶ میلی مولار به ترتیب موجب کاهش ۳۰ و ۲۵٪ فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا نشان شدند. تنها یون $AgNO_3$ موجب افزایش ۴ و ۳ برابری به ترتیب در غلظت ۳ و ۶ میلی مولار افزایش فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا نشاسته شد (شکل ۴-۱۹).

یون‌های $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$, $CoCl_2$, $BaCl_2$, $NaCl$ و $AgNO_3$ موجب افزایش فعالیت آنزیم بر روی پلوان شد که در بین آن‌ها یون‌های $AgNO_3$ و $BaCl_2$ بیشترین تاثیر را بر افزایش فعالیت (به ترتیب ۶۰ و ۱۰۰٪) داشتند. یون‌های $CaCl_2$, KCl و $LiCl$ تاثیری بر فعالیت نداشتند (شکل ۴-۲۰).

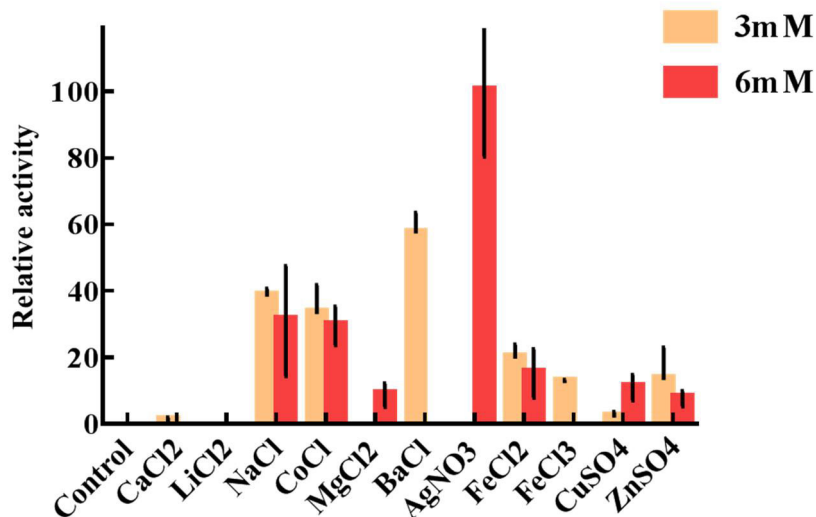
۴-۱۱ بررسی تاثیر حلال‌های آلی بر فعالیت Amy1136

تاثیر غلظت‌های ۱ و ۲ درصد حلال‌های آلی متانول، اتانول، ایزوپروپانول، ایزوبوتانول، گلیسرول، استون بر فعالیت آنزیم Amy1136، بر روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان با سه تکرار اندازه گیری شد (شکل ۴-۲۱). نتایج نشان داد که تمامی حلال‌های آلی تقریباً موجب کاهش فعالیت آنزیم شدند. غلظت ۱ و ۲٪ گلیسرول به ترتیب ۳۶ و ۵۶٪، غلظت ۱ و ۲٪ ایزوپروپانول به ترتیب ۴۹ و ۴۳٪،

غلظت ۱ و ۲٪ ایزوبوتانول به ترتیب ۶۳ و ۵۰٪، غلظت ۱ و ۲٪ اتانول به ترتیب ۵۰ و ۱۶٪، غلظت ۱ و ۲٪ استون به ترتیب ۵۰ و ۸۰٪ و غلظت ۱ و ۲٪ متانول ۵۰٪ فعالیت آنزیم بر روی سویسترا نشاسته را کاهش دادند.



شکل ۴-۱۹: اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۳ و ۶ میلی مولار یون‌های فلزی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سویسترا نشاسته اندازه‌گیری شد (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد).



شکل ۴-۲۰: اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم Amy1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۳ و ۶ میلی مولار یون‌های فلزی در دمای ۵۰ °C و pH = ۸ بر روی سویسترا پلوان اندازه‌گیری شد (کنترل صفر در نظر گرفته شد).

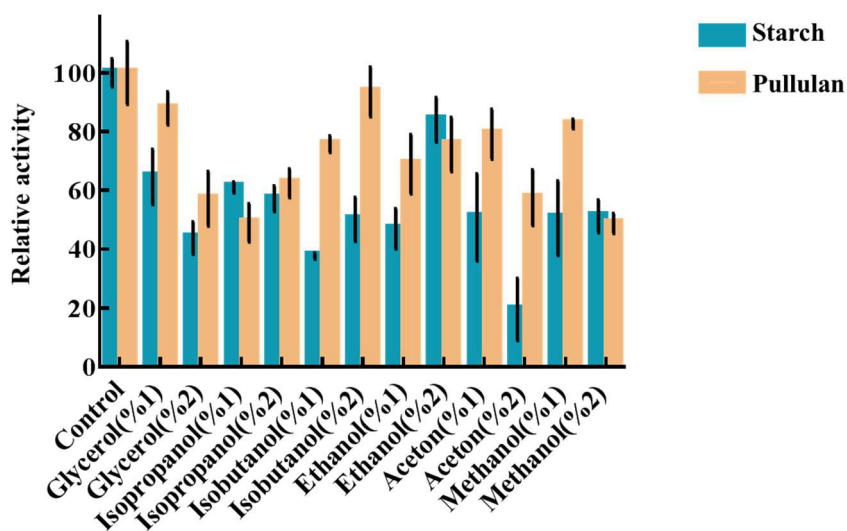
همچنین غلظت ۱ و ۲٪ گلیسرول به ترتیب ۱۲ و ۴۳٪، غلظت ۱ و ۲٪ ایزوپروپانول به ترتیب ۵۱ و ۳۸٪، غلظت ۱ و ۲٪ ایزوبوتانول به ترتیب ۲۵ و ۸٪، غلظت ۱ و ۲٪ اتانول به ترتیب ۳۱ و ۲۵٪، غلظت ۱ و ۲٪ استون به ترتیب ۱۹ و ۴۳٪ و غلظت ۱ و ۲٪ متانول به ترتیب ۱۸ و ۵۱٪ فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا پلوان را کاهش دادند.

۴-۱۲ بررسی تاثیر دترجنتها بر فعالیت Amy1136

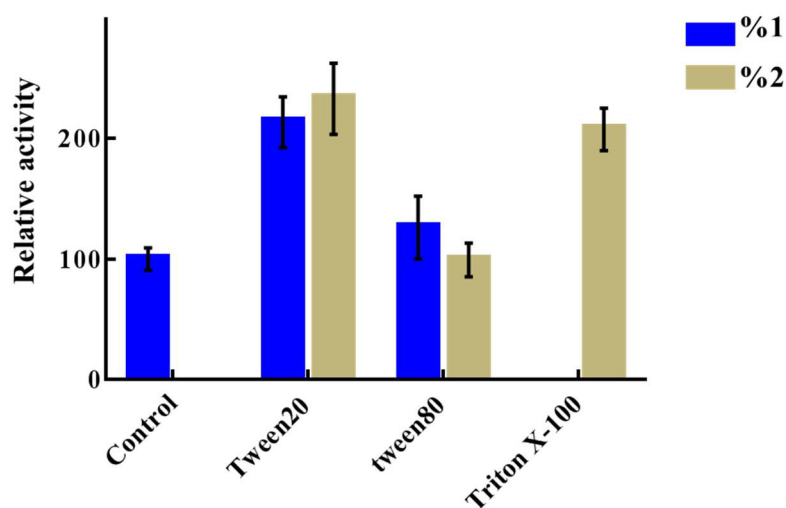
تاثیر غلظت‌های ۱ و ۲ درصد دترجنت‌ها از جمله تویین ۲۰، تویین ۸۰ و تریتون X-۱۰۰ بر فعالیت آنزیم Amy1136، بر روی سوبسترا نشاسته با سه تکرار اندازه‌گیری شد. (شکل ۴-۲۲). نتایج نشان داد که تویین ۲۰ و تریتون X-۱۰۰ موجب افزایش دو برابری فعالیت آنزیم شد.

۴-۱۳ بررسی تاثیر برخی مواد شیمیایی بر فعالیت Amy1136

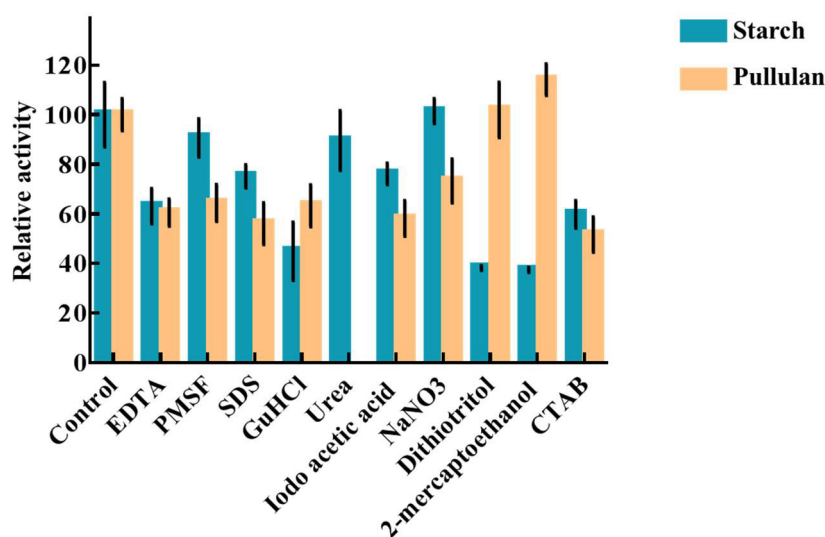
تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار مواد شیمیایی از جمله یدواستامید (IAM)، گوانیدین هیدروکلرید (GuHCl)، دی تیوتریتول (DTT)، سدیم آزید (NaNO_3)، بتامرکاپتواتانول، اوره، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) و سدیم دو دسی سولفات (SDS) بر فعالیت آنزیم Amy1136 بر روی دو سوبسترا نشاسته و پلوان با سه تکرار بررسی شد (شکل ۴-۲۳). نتایج نشان داد که NaNO_3 ، PMSF و اوره تاثیر خاصی بر فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا نشاسته نداشتند، اما فعالیت آنزیم بر روی نشاسته در حضور GuHCl، بتامرکاپتواتانول و DTT بیش از ۶۰٪ کاهش پیدا کرد. همچنین فعالیت آنزیم بر روی سوبسترا پلوان در حضور بتامرکاپتواتانول تا ۱۴٪ افزایش پیدا کرد و در حضور DTT تغییر خاصی نکرد، اما SDS و IAM حدود ۵۰٪ فعالیت آنزیم را کاهش دادند (تاثیر بقیه مواد کمتر از ۴۰٪ کاهش فعالیت بود).



شکل ۴-۲۱: اثر حلال‌های آلی بر فعالیت Amyl1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۱ و ۲ درصد حلال‌های آلی در دمای ۵۰ °C و ۸ = pH بر روی سویسترا نشاسته و پولان (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد).



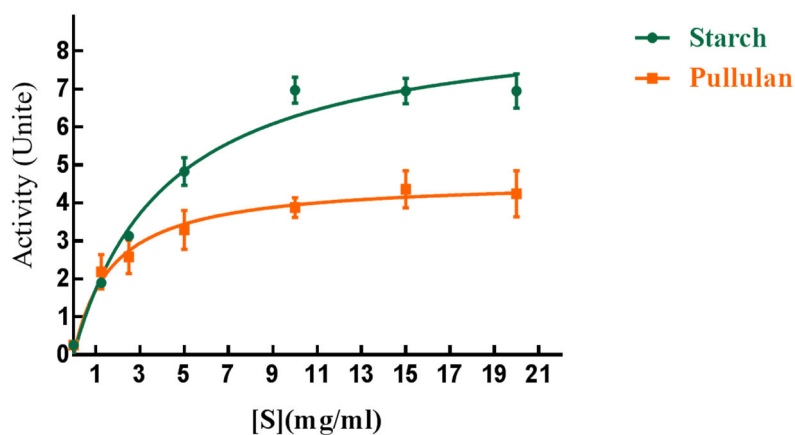
شکل ۴-۲۲: اثر دترجنت‌ها بر فعالیت Amyl1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های ۱ و ۲ درصد دترجنت‌ها در دمای ۵۰ °C و ۸ = pH بر روی سویسترا نشاسته و پولان (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد).



شکل ۴-۲۳: اثر مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم Amyl1136، فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۱ میلی مواد شیمیایی در دمای ۵۰ °C و pH=۸ بر روی سوبسترا نشاسته و پلوانان اندازه گیری شد (کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد).

۴-۱۴ تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم Amyl1136

تأثیر غلظت‌های ۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ (mg/ml) سوبسترا (نشاسته و پلوان) بر سرعت واکنش آنزیمی بررسی شد و نمودار میکائیلیس-منتن با نرم افزار Prism6 رسم گردید (شکل ۳-۲۴). پارامترهای کینتیکی آنزیم نیز محاسبه شد و در جدول ۴-۷ آورده شده است.



شکل ۳-۲۴: نمودار میکائیلیس-متن

جدول ۴-۷: تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم Amy1136

پارامتر	نشاسته	پولان
K_m (mg ml ⁻¹)	۴/۲	۱/۷۳
V_{max} (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	۶۵۰/۳۸	۳۳۷/۵۹
k_{cat} (s ⁻¹)	۱۱۲۹/۳۸	۵۸۶/۱
k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mg ml ⁻¹)	۲۶۹/۰۹	۳۳۷/۳۶

فصل پنجم

بحث و شهادت

استفاده از آنزیم‌های میکروبی به عنوان کاتالیزورهای زیستی در مقیاس صنعتی، مثال‌هایی از زیست فناوری سفید یا شیمی سبز (سازگار با محیط زیست) می‌باشند. واکنش‌های آنزیمی معمولاً تحت شرایط ملایمی انجام می‌شوند، بسیار اختصاصی هستند و بازده بالایی برای تولید محصول دارند. علاوه بر این، تنها مقدار کمی از آنزیم برای انجام واکنش، حتی در مقیاس صنعتی، مورد نیاز است و هر دو حالت جامد و مایع آنزیم، نیاز به فضای کمی برای نگهداری دارد. آنزیم‌ها از طریق کاهش مصرف مواد شیمیایی، آب، انرژی و کاهش تولید زباله، تاثیر تولید بر محیط زیست را کم می‌کنند. وقتی تمام مزایای استفاده از آنزیم‌ها در نظر گرفته شود، تعجب آور نیست که کاربردهای تجاری آنزیم‌ها هر ساله در حال افزایش است (Gurung et al., 2013). در میان منابع آنزیم‌های میکروبی، باکتری‌های گرمادوست، در دمای بالا فعال هستند. دمای بالا این قابلیت را به آنزیم می‌دهد که در شرایطی مثل غلظت بالای سوبسترا، ویسکوزیته پایین و آلودگی میکروبی کمتر، عملکرد بالایی داشته باشد (Vieille & Zeikus, 2001) اما، شرایط سخت مورد نیاز برای رشد و نگهداری این باکتری‌ها، مشکلاتی را برای جداسازی پروتئین از منابع بومی خود، در مقیاس وسیع، ایجاد می‌کند. همسانه سازی این امکان را فراهم می‌کند که مقدار زیادی از پروتئین‌های نوترکیب مقاوم به حرارت، در میزبانی مزوفیل بیان شوند (Zhu et al., 2011). در میان آنزیم‌های صنعتی که بیشتر آن‌ها در محیط آبی فعالیت می‌کنند کربوهیدرازها به دلیل مصرف گسترده در تولید محصولات نشاسته، شوینده‌ها، صنایع نساجی و نانوایی از لحاظ مصرف حائز رتبه دوم هستند. نشاسته پلی‌ساکارید اصلی ذخیره گیاهان است و از نظر تغذیه، تامین کننده ۷۰ تا ۸۰٪ انرژی مورد نیاز روزانه انسان می‌باشد و از لحاظ تامین کالری مورد نیاز در کشورهای جهان سوم، حائز اهمیت فراوان است. با توجه به کاربرد وسیع و متنوع نشاسته در کشاورزی و صنایع گوناگون می‌توان گفت که آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته جزو آنزیم‌های کاربردی به شمار می‌آیند، بنابراین می‌توانند در بیوتکنولوژی صنعتی و کشاورزی نقش مهمی را ایفا کنند. ترکیب مناسبی از آنزیم‌های آمیلولیتیک، به طور کامل نشاسته را به گلوکز تجزیه

می‌نمایند. آنزیم آمیلوپولوناز جزو آنزیم‌های آمیلولیتیک است. آنزیم آمیلوپولوناز پتانسیل بالایی در پروسه تولید قند از نشاسته را دارا می‌باشد این آنزیم پیوندهای α -(۱→۴) و α -(۱→۶) را در نشاسته، پلوان و دکسترین می‌شکند. از آنجا که اغلب فرآیندهای صنعتی مربوط به هیدرولیز نشاسته در دمای بالا (۶۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود، بنابراین استفاده از آنزیم‌های مقاوم به حرارت مناسب‌تر است. آنزیم مورد استفاده در این تحقیق آمیلوپولوناز ۱۱۳۶ می‌باشد که از ژنوم باکتری ترموفیل *Cohnella* sp. A01 جداسازی و در میزبان مزوفیل *E. coli* کلون و بیان شد.

E. coli در نخستین آزمایشات همسانه سازی برای تولید انسولین به عنوان یک پروتئین دارویی، توسط Lilly و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (Swartz, 2001). اشریشیاکلی متداول‌ترین میزبانی است که برای بیان بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Baneyx, 1999; Swartz, 2001; Farrokhi et al., 2009)، چرا که از طرفی شاخص‌های مناسب یک باکتری از جمله تسریع سریع‌تر، مصرف کم‌تر مواد اولیه، کنترل آسان، میزان بالای بیان پروتئین نو ترکیب و قدرت بالایی برای پذیرش ژن‌های بیگانه را دارد و از طرف دیگر وجود دانش زیاد در مورد ویژگی‌های ژنتیکی و بیولوژی مولکولی، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه سازی و گونه‌های میزبانی جهش یافته (Baneyx, 1999)، آن را به عنوان موجودی بسیار کارآمد در تحقیقات مهندسی ژنتیک و دست‌ورزی‌های ژنتیکی درآورده است. تجلی ژن‌های هترولوگوس در سیستم‌های میزبان باکتریایی و مخصوصاً در *E. coli*، ساده‌ترین و ارزان‌ترین تکنیک موجود برای سنتز پروتئین‌ها می‌باشد. همسانه‌سازی DNAهای هترولوگ داخل پلاسمیدهای با تعداد کپی پایین صورت می‌گیرد که سنتز زنجیره پروتئینی از آن‌ها هر ۳۵ ثانیه یک بار اتفاق می‌افتد که ناشی از رونویسی و ترجمه همزمان ژن‌ها در *E. coli* می‌باشد (Farrokhi et al., 2009)، امروزه بیش از ۵۰۰ نوع پروتئین نو ترکیب که اکثراً دارای کاربردهای دارویی هستند در اشریشیاکلی تولید شده اند (Gooday & Rathburn, 1999) از معایب اصلی *E. coli* به عنوان یک سیستم بیان‌کننده با وجود سهولت کاربردی و نیازهای محدود

سیستم بیان هتروولوگوسی، مشکل تولید پروتئین‌های فعال یوکاریوتی است، زیرا تاخوردگی به صورت ناقص بوده یا اصلا صورت نمی‌گیرد. پروتئین‌های دارای کمتر از ۱۰۰ اسیدآمینه به سرعت به داخل پیکربندی طبیعی شان تاخوردگی سریع آن‌ها می‌باشد. در مقابل، مولکول‌های پروتئینی بزرگ اغلب توده‌ای می‌شوند و اجتماع پروتئینی غیرفعال به نام اینکلوزن بادی^۱ را تولید می‌کنند و به صورت آنفولد^۲ یا میسفولد^۳ در می‌آیند که برای رسیدن به پروتئین سالم و با تاخوردگی صحیح و خالص باید مراحل زیادی طی شود و یا این مولکول‌های پروتئینی بزرگ، تجزیه شوند. برخی از تکنیک‌ها برای دستکاری سیستم تاخوردگی سلولی ایجاد شده است تا مانع از تشکیل این اجسام گردد. در اولین تکنیک جایگزین‌های آمینواسیدی و استفاده از پروتئین‌های فرعی نظیر چاپرون‌ها ممکن است شانس تاخوردگی صحیح را افزایش دهد. در برخی موارد تغییراتی در شرایط رشد مانند کاهش دمای انکوباسیون یا تغییر ویسکوزیته محیط ممکن است منجر به کندی کینتیک تاخوردگی گردد و زمان کافی را برای هر اسیدآمینه جهت پیدا کردن پیکربندی صحیح‌شان درون پلی‌پپتید فراهم کند که ممکن است منجر به تشکیل پروتئین‌های فعال شود. اما دستکاری سیستماتیک شرایط آزمایشگاهی می‌تواند عمل بسیار زمان‌بری باشد و در کل امتحان کردن سیستم محدود در تشکیل باندهای دی-سولفیدی که برای فعالیت پروتئینی در گیاهان و جانوران ضروری می‌باشد، از دیگر معایب این سیستم بیان کننده می‌باشد، همچنین باکتری‌ها دارای ظرفیت محدودی برای اصلاحات پس از ترجمه هستند (Farrokhi et al., 2009)، مشکل دیگر در سیستم‌های باکتریایی محصولات سمی و بیماری‌زا مانند اندوتوکسین همراه پروتئین مورد نظر است که این مساله از نظر دارویی کیفیت محصول را کم می‌کند. از طرفی پروتئین‌های تولید شده در سیتوپلاسم *E. coli* دارای یک اسیدآمینه فرمیل متیونین اضافی در انتهای آمینی هستند که ممکن است ویژگی‌های بیولوژیکی پروتئین را

1. Inclusion
2. Unfold
3. Misfold

تغییر و یا حتی به عنوان یک ایموزن^۱ عمل کند (Epstein, 1994)، با توجه به این که آنزیم‌ها در صنایع مختلف در معرض دماهای بالا قرار می‌گیرند در این پژوهش هدف تولید آنزیم نوترکیب آمیلوپولولانازاز یک منشا گرمادوست جهت مقاومت و پایداری آن در برابر دماهای بالا می‌باشد، نظر به اهمیت این آنزیم در صنعت بیوتکنولوژی، کشاورزی، پزشکی، داروسازی حجم زیادی از این آنزیم در ایران وارد شده است و با توجه به هزینه‌ی بالای این کار، در حوضه‌ی بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک اقدام به تولید این آنزیم به صورت پروتئین نوترکیب و بررسی خصوصیات شیمیایی این آنزیم گردید.

ژن *Amy1136* با طول ۱۱۶۶ جفت باز کدکننده‌ی آنزیم آمیلوپولولاناز ۱۱۳۶ با طول ۷۲۲ آمینواسید می‌باشد. تاکنون مطالعات زیادی بر روی آمیلوپولولانازهای باکتری‌های مختلف به صورت Native و بررسی همسانه سازی درون میزبان‌های مهندسی شده انجام پذیرفته که از جمله منبع این آنزیم‌ها می‌توان به گونه‌های مختلف *Bacillus* (Takasaki, 1987, Shen et al., 1990, Lin et al., 1996, Roy et al., Brunswick et al., 1999, Ara et al., 1995, Vishnu et al., 2006, Sang-Pil et al., 1994, al., 2003)، گونه‌های *Geobacillus* (Noorwez et al., 2006, Zareian et al., 2010)، گونه‌های *Clostridium* (Spreinat & Saha et al., 1990, Hyun & Zeikus, 1985; Melasniemi, 1987)، گونه‌های *Thermoanaerobium* (Antranikian, 1990, Plant et al., Coleman et al., 1987)، گونه‌های *Thermotoga* (Koch et al., 1987, Koch et al., 1987, et al., 1987, Bibbel et al., 1987) و *Thermococcus profundus* (Kwak et al., 1998) اشاره کرد.

با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی وجود دومین‌های غیرکاتالیتیکی مربوط به لایه سطحی در توالی پروتئینی نشان می‌دهد که آنزیم *Amy1136* قادر به اتصال به لایه پپتیدوگلیکانی نیست و نوعی اگزوانزیم می‌باشد، که به لایه سطحی متصل می‌شود. در بررسی بیوانفورماتیکی خصوصیات

بیوشیمیایی، مقایسه شاخص پایداری آنزیم Amy1136 با سایر آمیلوپولولانازهای باکتری‌های شناخته شده خانواده‌های ۱۳ و ۵۷ نشان داد که Amy1136 نسبت به آمیلوپولولانازهای باکتری‌های *Geobacillus*، *Geobacillus stearothermophilus*، *Cyanobacterium* sp. CLg1، *Pyrococcus*، *Streptococcus suis* P1/7، *Lactobacillus paracasei*، *thermoleovorans*، *Caldvirga maquilingensis*، *Staphylothermus marinus* F1، *furiosus* DSM 3638، *Thermococcus*، *Staphylothermus marinus* F1، *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 و *Thermococcus litoralis*، *Thermococcus kodakarensis* KOD1، *hydrothermalis* و *Thermococcus* sp. HJ21 از پایداری بالاتری برخوردار است. همچنین مقایسه شاخص آلیفاتیک نشان می‌دهد Amy1136 نسبت به آمیلوپولولانازهای جداسازی شده از باکتری‌های ۵۷ از پایداری حرارتی بالاتری برخوردار است. با توجه به اینکه ساختار آمیلوپولولانازها کریستالوگرافی نشده است، نمی‌توان بر اساس مدل همولوژی به پیش‌گویی ساختار سه بعدی آنزیم پرداخت همچنین آمیلوپولولاناز این تحقیق بر اساس توالی آمینواسیدی دارای تفاوت چشمگیری نسبت به آمیلوپولولانازهای به ثبت رسیده می‌باشد، که در این مطالعه به صورت آزمایشگاهی موفق شدیم تا نشان دهیم که ژن نو ترکیب، آنزیمی را تولید می‌کند که فعالیت آنزیمی آمیلوپولولانازی از خود نشان می‌دهد.

خالص‌سازی Amy1136 به صورت تک مرحله‌ای و بدون استفاده از روش‌های کروماتوگرافی و یا ژل فیلتراسیون، با روش شوک حرارتی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت، به دلیل پایدار بودن آنزیم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، پس از گذشت ۱۵ دقیقه، تمامی پروتئین‌های میزبان به جز Amy1136 رسوب کردند و آنزیم بالای ۹۰٪ با این روش خالص شد. مشابه این روش خالص‌سازی در آنزیم‌های آمیلوپولولاناز نو ترکیب باکتری‌های *Pyrococcus furiosus* و *Thermoanaerobacterium* (Ramesh et al., 1994) *saccharolyticum* B6A-RI که در این گونه‌ها مرحله اول خالص‌سازی با شوک حرارتی انجام گرفت.

پس از خالص سازی Amy1136، بهینه‌سازی بیان آنزیم برای دریافت حداکثر فعالیت به روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی انجام گرفت، قبل از بهینه‌سازی با روش پلاکت برمن فاکتورهای تاثیرگذار در بیان آنزیم برای حداکثر فعالیت آن انتخاب شدند، فاکتورها به ترتیب اثرگذاری، جمعیت باکتری، دما و دور چرخش برای تلقیح IPTG تعیین شدند. معنی‌داری مدل و فاکتورهای مورد بررسی بر اساس F -Valu و $Prob > F$ تعیین می‌شود. در این طراحی نیز p -Valu کمتر از ۰/۱ مدل و فاکتورهای دما، دور چرخش و جمعیت باکتری، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین سطوح این فاکتورها است. استفاده از طراحی پلاکت برمن برای تعیین فاکتورهای تاثیرگذار در تولید و فعالیت پلوانازها بر روی پلواناز باکتری *Exiguobacterium* sp. SH3 (Rajaei et al., 2014) و *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 (Mrudula et al., 2011) انجام گرفته است که در این گونه‌ها برخلاف این تحقیق که شرایط بیان مورد بررسی قرار گرفته است، ترکیبات محیط کشت نیز بررسی شد.

شرایط بهینه فاکتورهای تاثیرگذار به روش سطح پاسخ نیز تعیین شد. ضریب تغییرات^۱ (CV) برابر با ۶/۲۶٪ نیز بیانگر دقت بالا آزمایش می‌باشد (Zou et al., 2016). در تحلیل آماری، معنی‌دار نشدن Lack of fit نشان‌دهنده درستی آزمایش است. در این تحقیق F -Valu برابر با ۲/۸۶ و P -Valu برابر با ۰/۱۳۶۴ (کمتر از ۰/۰۵) برای Lack of fit نشان می‌دهد که معنی‌دار نبوده و آزمایش مناسب می‌باشد. P -Valu برابر با ۲۵/۹۷ و $Prob > F$ برابر با ۰/۰۰۰۱ نشان می‌دهد مدل آزمایش معنی‌دار می‌باشد. در تحلیل واریانس داده‌ها P -Valu کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد که مدل معنی‌دار بود و P -Valu بیش‌تر از ۰/۱ در روش سطح پاسخ نشان می‌دهد مدل معنی‌دار نبود (Li et al., 2007). در تولید آنزیم Amy1136، دما معنی‌دار نبود، دور چرخش و جمعیت باکتری معنی‌دار بودند، همچنین اثر بین دما و دور چرخش، دما و جمعیت باکتری در عملکرد آنزیم معنی‌دار بودند، و اثر بین دور

1. Coefficient of variation

چرخش و جمعیت باکتری معنی‌دار نبود (جدول ۴-۶). بیشترین تاثیر در عملکرد آنزیم، برهمکنش بین دما و دور چرخش بود، به طوری که، در محدوده شرایط آزمایش، دما و میزان جمعیت باکتری در محدوده مرکزی منجر به

افزایش میزان پاسخ می‌شود.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که آنزیم Amy1136 با فعالیت در دمای بهینه 50°C و همچنین فعالیت بالای 50% تا دمای 70°C ، تاییدی بر گرمادوست بودن آنزیم می‌باشد. pH بهینه فعالیت هم ۸ می‌باشد. مشابه این نتیجه در آمیلوپولولانازهای *Bacillus* و *Bacillus* sp. KSM-1378 و *Bacillus* *circulans* F-2 (Zareian et al. 2010)، که دمای بهینه فعالیت در این منابع 50°C و pH بهینه فعالیت قلیایی بود. Amy1136 پس از گذشت ۴ ساعت در دمای 50°C ، فعالیتش نسبت به فعالیت اولیه زیاد شد، همچنین بعد از ۴ ساعت قرارگیری در دماهای 70°C و 90°C به ترتیب ۱۰۰ و بیش از 50% درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شد. تقریباً مشابه این موضوع در آمیلوپولولانازهای ۳ باکتری‌های شدیداً گرمادوست گزارش شد، از جمله آنزیم‌های TsiApu، TsiApuN و MTsiApuN از باکتری *Thermococcus siculi*، که پس از ۵ ساعت قرارگیری در دمای 80°C و 90°C به ترتیب بیش از 90% و حدود 85% فعالیت خود حفظ شد (Jiao et al., 2011)، همچنین آنزیم آمیلوپولولاناز باکتری *Geobacillus thermoleovorans* پس از ۴ ساعت قرارگیری در دمای 90°C درجه سانتی‌گراد 80% فعالیت آن حفظ شد، آمیلوپولولاناز باکتری *Thermococcus kodakarensis* KOD1 نیز پس از ۴ ساعت قرارگیری در دمای 90°C درجه سانتی‌گراد حدود 80% در حضور Ca^{2+} و در عدم حضور Ca^{2+} ، کمتر از 60% فعالیت حفظ شد. پایداری Amy1136 در دماهای بالا نسبت به آمیلوپولولانازهای (Saha et al., *Thermoanaerobacter* Strain B6A، (Zareian et al., 2010) Iranian *Bacillus* sp. (1990)، *Bacillus subtilis* DR8806 (Asoodeh & Lagzian, 2012)، آمیلوپولولانازهای gt-apu و

gt-apuT از باکتری *Geobacillus thermoleovorans* NP33 (Nisha & Satyanarayana, 2013a), *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E (Mathupala & Zeikus, 1993) بیشتر می-باشد.

Amy1136 در pHهای اسیدی و قلیایی دارای فعالیت و پایداری خوبی بود، به طوریکه پس از گذشت ۲۴ ساعت در pHهای ۴، ۸ و ۱۱ به ترتیب ۴۵، ۹۰ و ۶۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شد، مشابه این نتیجه که آنزیم هم در pHهای قلیایی و هم اسیدی پایدار است در آنزیم باکتری شدیداً گرمادوست *G. thermoleovorans* (Nisha & Satyanarayana, 2014) که بعد از ۲ ساعت ۷۰٪ فعالیت اولیه آنزیم در pH = ۵ و ۲۵٪ فعالیت اولیه در pH = ۹ کاهش پیدا کرد، این در صورتی است که آنزیم Amy1136 پس از ۲ ساعت ۵۰٪ فعالیت آمیلازی و ۴۰٪ فعالیت پلولانازی در pH = ۵ و ۲۰٪ فعالیت آمیلازی و ۱۰٪ فعالیت پلولانازی در pH = ۹ فقط از دست رفت. ۳ آمیلوپولوناز بررسی شده باکتری *T. siculi* با اینکه پایداری خوبی در دمای بالا از خود نشان دادند اما تنها در pHهای اسیدی پایدار بودند (Jiao et al., 2011).

باتوجه به این که Amy1136 نسبت به شرایط اسیدی و قلیایی و همچنین دمای بالا پایدار است می-تواند کاربرد خوبی در صنایع قندسازی نشاسته، پخت و پز و شست و شو داشته باشد (Ara et al., 1995; Jiao et al. 2011; Roy & Gupta, 2004).

در بین یونهای فلزی Ag^+ موجب افزایش چندین برابری فعالیت آمیلاز و پلولاناز آنزیم Amy1136 شده است، اما به دلیل گران بودن نقره استفاده از آن به عنوان کوفاکتور مقرون به صرفه نمی-باشد. یونهای Co^{2+} ، Ba^{2+} و Li^{2+} فعالیت آمیلازی را مهار کردند، یونهای Mg^{2+} ، Na^{2+} ، Fe^{2+} و Fe^{3+} مقدار کمی فعالیت آمیلازی را کاهش دادند و یونهای Cu^{2+} ، Zn^{2+} ، Mn^{2+} تاثیری بر فعالیت آمیلازی نداشتند؛ این در حالی است که یونهای Co^{2+} ، Ba^{2+} ، Mg^{2+} ، Na^{2+} ، Fe^{2+} ، Fe^{3+} ، Cu^{2+} ، Zn^{2+} موجب

افزایش فعالیت پلوانازی شدند و Li^{2+} تأثیری بر فعالیت پلوانازی نداشت تأثیر متفاوت یون‌های فلزی بر فعالیت آمیلاز و پلواناز تقریباً بر روی آنزیم *T. ethanolicus* 39E گزارش شده است (Lin & Leu, 2002). یون Ca^{2+} تأثیری بر فعالیت آمیلازی و پلوانازی Amy1136 ندارد، این مشاهد نشان می‌دهد که آنزیم Amy1136 غیروابسته به کلسیم می‌باشد. غیروابسته بودن به کلسیم یک برتری در صنعت قندسازی می‌باشد، زیرا یون کلسیم اولاً موجب مهار آنزیم گلوکزایزومراز در مرحله تبدیل گلوکز به فروکتوز می‌شود، ثانیاً حذف یون کلسیم در مراحل بعدی واکنش موجب افزایش هزینه‌های مصرفی می‌شود (Nisha & Satyanarayana, 2016). غیروابسته بودن به کلسیم در صنعت شست‌وشو نیز می‌تواند برتری باشد زیرا یون کلسیم در فرآیند شست‌وشو کلاته می‌شود.

اولین بار آسوده و لغزبان (۲۰۱۲) فعالیت و پایداری گلوکونوآمیلوپلواناز باکتری *B. subtilis* DR8806 را غیروابسته به کلسیم گزارش کردند، مشابه این نتیجه در آمیلوپلوانازهای *C. thermosulfurogenes* SVM17 (Mrudula et al., 2011)، *gt-apu* (Nisha & Satyanarayana, 2013a) و *G. thermoleovorans* (Nisha & Satyanarayana 2014) گزارش شده است. وابستگی به یون کلسیم در آمیلوپلوانازها/ آلفاآمیلاز- پلوانازها وجود دارد و در *T. ethanolicus* 39E، *Pyrococcus furiosus* و *P. woesei* گزارش شده است (Lin, 2002).

کاهش فعالیت Amy1136 در برابر PMSF نشان می‌دهد که گروه‌های هیدروکسیل در کاتالیز نقش دارند. تأثیر کم مهارکننده‌های سولفیدریل از جمله یدواستیک‌اسید، دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول در فعالیت پلوانازی نشان می‌دهد که گروه‌های تیول نقشی در فعالیت پلوانازی ندارند (Nisha & Satyanarayana, 2014). دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول موجب کاهش بیش از ۵۰٪ فعالیت آمیلازی شدند.

آنزیم در برابر سورفکتانت‌های غیر یونی Tween20، Tween80 و Triton X-100 به خوبی پایدار بوده فعالیت آن در غلظت‌های ۱ و ۲٪ افزایش داشته است، و در برابر سورفکتانت آنیونی SDS (۱ mM) مقدار کمی از فعالیت کم شد. پایداری آنزیم در pHهای قلیایی در حضور دترجنت‌ها نشان می‌دهد که می‌تواند در فرمولاسیون مواد شوینده اهمیت داشته باشد (Nisha & Satyanarayana, 2014).

استفاده از حلال‌های آلی به جای محیط آبی طبیعی آنزیم، می‌تواند به طور چشمگیری کاربرد صنعتی آنزیم را افزایش دهد. در واقع حلال‌های آلی با اثرات فیزیکوشیمیایی متنوعی که بر روی آنزیم‌ها دارند، فعالیت آنزیم‌ها را به مقدار قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌دهند (Laane, 1987). مطالعات نشان داده است، در برخی موارد که انجام واکنش آنزیمی در آب غیر ممکن است در حضور حلال‌های آلی انجام شدنی است (Alexander, 2001). از طرف دیگر، گزارش شده است که حلال‌های آلی با جذب آب اطراف پروتئین که برای گروه‌های عملکردی آنزیم ضروری هستند، باعث واسرشتگی آن‌ها می‌شوند (Tahir, 2009). بنابراین فعالیت و مقاومت آنزیم در حضور حلال‌ها می‌تواند امتیاز بزرگی برای کاربرد در صنعت باشد. در این تحقیق نیز تاثیر غلظت‌های ۱ و ۲٪ برخی حلال‌های آلی بر روی فعالیت آنزیم بررسی شد و نشان داد ایزوبوتانول تقریباً تاثیری بر فعالیت پلولانازی Amy1136 ندارد و بقیه حلال‌ها نیز کمتر از ۵۰٪ (به جز گلیسرول ۲٪، ایزوبوتانول ۱٪ و استون ۲٪) موجب کاهش فعالیت شدند که این کاهش در فعالیت آمیلازی بیشتر از فعالیت پلولانازی مشاهده شد.

با محاسبه V_{max} ، K_m و کارایی کاتالیتیکی، آنزیم از لحاظ کینتیکی مورد بررسی قرار گرفت. K_m معیاری از تمایل آنزیم به سوبسترا می‌باشد. در واقع هرچه این مقدار کمتر باشد میزان تمایل اتصال آنزیم به سوبسترا بیشتر است. برای تعیین کارآمدی آنزیم در یک صنعت می‌توان کارایی کاتالیتیکی را ملاک قرار داد. هرچه این مقدار بیشتر باشد احتمالاً آنزیم هم کاراتر خواهد بود. مطالعات کینتیکی بر روی Amy1136 نشان داد سرعت ماکسیمم در فعالیت آمیلازی بیشتر از فعالیت پلولانازی می‌باشد

($V_{max} = 650/38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ برای آمیلاز و $V_{max} = 337/59 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ برای پلواناز) این در صورتی است که میل ترکیب آنزیم به سوبسترای پلوان بیشتر است یعنی آنزیم در غلظت کمتری از پلوان به حداکثر سرعت می‌رسد ($K_m = 4/2$ برای سوبسترا نشاسته و $K_m = 1/73$ برای سوبسترای پلوان)، مشابه این نتیجه در *L. plantarum* L137 (Kim et al., 2009) و *T. ethanolicus* 39E (Lin & Leu, 2002) مشاهده شد، در گونه اول مانند گزارش این تحقیق V_{max} بیشتر و K_m بزرگتر برای فعالیت آمیلازی به دست آمد، اما در گونه دوم برعکس این تحقیق یعنی V_{max} بیشتر و K_m بزرگتر برای فعالیت پلواننازی به دست آمد. در هر دوی این گونه‌ها V_{max} برای هر دو فعالیت کمتر Amy1136 گزارش شد. در گونه اول عدد K_m در مورد هر دو سوبسترا بزرگتر از Amy1136 ولی در گونه دوم عدد K_m برای پلوان بزرگتر و برای نشاسته کوچکتر از این تحقیق گزارش شد. عدد K_m برای سوبسترا نشاسته در آنزیم *Desulfurococcus mucosus* DSM 2162 (Duffner et al., 2000) بزرگتر از Amy1136 گزارش شد. با اینکه V_{max} آنزیم Amy1136 کمتر از آنزیم *Geobacillus thermoleovorans* (Nisha & Satyanarayana, 2014) و K_m بیشتر می‌باشد، اما راندمان کاتالیتیکی برای هر دو فعالیت (k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mg ml}^{-1}$) برای فعالیت آمیلازی $269/09$ و برای فعالیت پلواننازی $373/4$) بیشتر از گونه ذکر شده می‌باشد. فعالیت آمیلازی آنزیم Amy1136 همچنین نسبت به فعالیت آمیلازی آنزیم‌های *T. kodakarensis* KOD1 (Guan et al., 2013)، *P. furiosus* (Dong et al., 1997)، *T. siculi* (Jiao et al., 2011)، *Staphylotherm marinus* (Li et al., 2013)، *Desulfurococcus mucosus* (Duffner et al., 2000)، *P. woesei* (Rudiger et al., 1995) و فعالیت پلواننازی آن نیز نسبت به آنزیم‌های *T. kodakarensis* KOD1 (Guan et al., 2013) و *P. woesei* (Rudiger et al., 1995) از راندمان کاتالیتیکی بالاتری برخوردار بود.



پیشنهادات

تعیین فعالیت آنزیم بر روی سوبستراهای خانواده آلفاآمیلاز

ایجاد جهش‌های هدفمند جهت بالا بردن فعالیت

تعیین نحوه‌ی تاخوردگی پروتئین Amy1136 و انجام مطالعات مربوط به ساختار دوم

تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین Amy1136

انجام مطالعات بیوانفورماتیکی مربوط به منشا آنزیم

تلاش جهت کاربردی شدن آنزیم در صنعت

منابع



منابع

- Ara, K., Igarashi, K., Saeki, K., & Ito, S. (1995). An alkaline amylopullulanase from alkalophilic *Bacillus* sp KSM-1378 - kinetic evidence for 2 independent active-sites for the α -1,4 and α -1,6 hydrolytic reactions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 662–666.
- Lee, S., Morikawa, M., Takagi, M., Imanaka, T. (1994). Cloning of the *aapT* gene and characterization of its product , α -amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaline *Bacillus* sp. strain XAL601, 3764–3773.
- Bai, Y., Huang, H., Meng, K., Shi, P., Yang, P., Luo, H., Luo, C., Feng, Y., Zhang, W., Yao, B. (2012). Identification of an acidic α -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. *Food Chemistry*, 1473–1478.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 411–421.
- Bibel, M., Brettl, C., Gosslar, U., Kriegshauser, G., & Liebl, W. (1998). Isolation and analysis of genes for amyolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters*, 9–15.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 254, 248–254.
- Brown, S. H., & Kelly, R. M. (1993). Characterization of amyolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2614–2621.
- Brunswick, J. M., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1999). The amylopullulanase of *Bacillus* sp. DSM 405. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 170–175.
- Canganella, F., Andrade, C. M., & Antranikian, G. (1994). Characterization of amyolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Fervidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 239–245.



- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Research*, 233–238.
- Champenois, Y., Della valle, G., Planchot, V., Buleon, A., & Colonna, P. (1999). Influence of α -amylases on bread staling and on retrogradation of wheat starch models. *Sciences Des Aliments*, 471–486.
- Chiang, C. M., Yeh, F. S., Huang, L. F., Tseng, T. H., Chung, M. C., Wang, C. S., Lur, H. S., Shaw, J. F., Yu, S. M. (2005). Expression of a bi-functional and thermostable amylopullulanase in transgenic rice seeds leads to autohydrolysis and altered composition of starch. *Molecular Breeding*, 125–143.
- Choi, K.-H., & Cha, J. (2015). Membrane-bound amylopullulanase is essential for starch metabolism of *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639. *Extremophiles*, 909–920.
- Coleman, R. D., Yang, S. S., & McAlister, M. P. (1987). Cloning of the debranching-enzyme gene from *Thermoanaerobium brockii* into *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 4302–7.
- Doman-Pytka, M., & Bardowski, J. (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical Reviews in Microbiology*, 107–121.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., & Zeikus, J. G. (1997). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 3569–3576.
- Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J. T., Wagner, K., & Antranikian, G. (2000). A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: Cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 6331–6338.
- Dziezak, J. D. (1989). Ingredients for sweet success. *Food Technology*.

- Epstein, J. I. (1994). Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (Stage T1 c) prostate cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 368.
- Erra-pujada, M., Debeire, P., Duchiron, F., & Donohue, M. J. O. (1999). The type II pullulanase of *thermococcus hydrothermalis*: Molecular characterization of the gene and expression of the catalytic domain. *Journal of Bacteriology*, 3284–3287.
- Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, R. A., Fincher, G. B. (2009). Plant genomics. *BioTechniques*, 295–297.
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, 1–19.
- Ganghofner, D., Kellermann, J., Staudenbauer, W. L., Bronnenmeier, K. (1998). Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an α -glucosidase in the amyolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 302–308.
- Gerday, C. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 103–107.
- Gooday, A. J., & Rathburn, A. E. (1999). Temporal variability in living deep-sea benthic foraminifera: a review. *Earth-Science Reviews*, 187–212.
- Guan, Q., Guo, X., Han, T., Wei, M., Jin, M., Zeng, F., Liu, L., Li, Z., Wang, Y., Cheong, G. W., Zhang, S., Jia, B. (2013). Cloning, purification and biochemical characterisation of an organic solvent-, detergent-, and thermo-stable amylopullulanase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Process Biochemistry*, 878–884.
- Guzman-Maldonado, H., & Paredes-Lopez, O. (1995). Amyolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 373–403.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases.



- Enzyme and Microbial Technology, 235–251.
- Hatada, Y. (1996). Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes α -1,4 and α -1,6 linkages in polysaccharides at different active sites. *Journal of Biological Chemistry*, 24075–24083.
- Hatada, Y., Saito, K., Hagihara, H., Ozaki, K., & Ito, S. (2001). Nucleotide and deduced amino acid sequences of an alkaline pullulanase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp. KSM-1876, 367–371.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., & Ariff, A. Bin. (2012). Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 11302-11318.
- Hwa, K., & Jaeho, C. (2015). Membrane-bound amylopullulanase is essential for starch metabolism of *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639. *Extremophiles*, 909–920.
- Hyun, H. H., & Zeikus, J. G. (1985). General biochemical characterization of thermostable extracellular beta-amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1162–1167.
- Janecek, S., Svensson, B., MacGregor, E. A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1149–1170.
- Jiao, Y. L., Wang, S. J., Lv, M. S., Xu, J. L., Fang, Y. W., & Liu, S. (2011). A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *thermococcus siculi*: Expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 222–228.
- Kahar, U. M., Chan, K., Salleh, M., & Hii, S. M. (2013). A high molecular-mass *Anoxybacillus* sp. SK3-4 amylopullulanase: Characterization and its relationship in carbohydrate utilization. *Journal of Molecular Sciences*, 11302–11318.
- Kim, J., Sunako, M., Ono, H., & Murooka, Y. (2008). Characterization of gene



- encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 449–459.
- Kim, J., Sunako, M., Ono, H., Murooka, Y., Fukusaki, E., & Yamashita, M. (2009). Characterization of the C-terminal truncated form of amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124–129.
- Koch, R., Zabłowski, P., & Antranikian, G. (1987). Highly active and thermostable amylases and pullulanases from various anaerobic thermophiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 192–198.
- Kulp, K., Ponte, J. G., & D'Appolonia, B. L. (1981). Staling of white pan bread: Fundamental causes. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–48.
- Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). The Concept of the alpha-amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 557–565.
- Kwak, Y. S., Akiba, T., & Kudo, T. (1998). Purification and characterization of α -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkages. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 363–367.
- Lee, Y., Seo, S., Yoon, S., Kim, S., Hahn, B., Sim, J., Koo, B., & Lee, C. (2016). Identification of a novel alkaline amylopullulanase from a gut metagenome of *Hermetia illucens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 514–521.
- Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 233- 238.
- Li, X., Li, D., & Park, K. H. (2013). An extremely thermostable amylopullulanase from *Staphylothermus marinus* displays both pullulan- and cyclodextrin-degrading activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5359–5369.



- Li, X., & Li, D. (2015). Preparation of linear maltodextrins using a hyperthermophilic amylopullulanase with cyclodextrin- and starch-hydrolysing activities. *Carbohydrate Polymers*, 134–141.
- Li, Y., Liu, Z., Zhao, H., Xu, Y., & Cui, F. (2007). Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 82–86.
- Lin, F. P., & Leu, K. (2002). Cloning, Expression, and characterization of thermostable feqion of amylopullulanase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *Appl Biochem Biotechnol*, 33–44.
- Lin, H. Y., Chuang, H. H., & Lin, F. P. (2008). Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the non-necessity of its 100 C-terminal amino acid residues. *Extremophiles*, 641–650.
- Lin, L. L., Tsau, M. R., & Chu, W. S. (1996). Purification and properties of a 140 kDa amylopullulanase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 101–107.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy). *Nucleic Acids Research*, 490–495.
- MacGregor, E. A., Janecek, S., & Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1–20.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., & Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, D222–D226.
- Mathupala, S. P., Lowe, S. E., Podkovyrov, S. M., Zeikus, J. G. (1993). Sequencing of

- the amylopullulanase (*apu*) gene of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, and identification of the active site by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 16332–16344.
- Mathupala, S., Saha, B. C., & Zeikus, J. G. (1990). Substrate competition and specificity at the active site of amylopullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 126–132.
- Mathupala, S. P., & Zeikus, J. G. (1993). Improved purification and biochemical characterization of extracellular amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *Appl Microbiol Biotechnol*, 487–493.
- Melasniemi, H. (1987). Characterization of α -amylase and pullulanase activities of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical Journal*, 193–197.
- Melasniemi, H. (1988). Purification and some properties of the extracellular α -amylase-pullulanase produced by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *The Biochemical Journal*, 813–818.
- Moller, M. S., Henriksen, A., & Svensson, B. (2016). Structure and function of α -glucan debranching enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, .
- Mrudula, S., Reddy, G., & Seenayya, G. (2011). Optimization of medium components using response surface methodology for production of thermostable amylopullulanase in submerged fermentation by *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *Malaysian Journal of Microbiology*, 181–191.
- Nakamura, Y., Kubo, A., Harada, K., Nakakita, M., Matsuda, T., Shimamune, T., & Satoh, H. (1996). Characteristics of carbohydrate metabolism in sugary mutants of rice endosperms and some properties of starch debranching enzymes (DE). *Plant and Cell Physiology*, 14.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2013a). Characterization of recombinant amylopullulanase (*gt-apu*) and truncated amylopullulanase (*gt-apuT*) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch



- saccharification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6279–6292.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2013b). Recombinant bacterial amylopullulanases: Developments and perspectives. *Bioengineered*, 2165-5987.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2014). Characterization and multiple applications of a highly thermostable and Ca^{2+} -independent amylopullulanase of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2594–2615.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2015). The role of N1 domain on the activity, stability, substrate specificity and raw starch binding of amylopullulanase of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2016). Characteristics , protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Noorwez, S. M., Ezhilvannan, M., Satyanarayana, T. (2006). Production of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca^{2+} - independent amylopullulanase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* in submerged fermentation. *Journal of Biotechnology*, 337–345.
- Plant, A. R., Morgan, H. W., & Daniel, R. M. (1986). A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 668–672.
- Plant, A. R., Clemens, R. M., Morgan, H. W., & Daniel, R. M. (1987). Active-site- and substrate-specificity of *Thermoanaerobium* Tok6-B1 pullulanase. *The Biochemical Journal*, 537–41.
- Plant, A. R., Clemens, R. M., Daniel, R. M., & Morgan, H. W. (1987). Purification and preliminary characterization of an extracellular pullulanase from *Thermoanaerobium* Tok6-B1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 427–433.
- Rajaei, S., Heidari, R., Zahiri, H. S., Sharifzadeh, S., Torktaz, I., & Noghabi, K. A. (2014). A novel cold-adapted pullulanase from *Exiguobacterium* sp. SH3:

- Production optimization, purification, and characterization. *Starch/Staerke*, 66(3-4), 225–234.
- Ramesh, M. V., Podkovyrov, S. M., Lowe, S. E., Zeikus, J. G. (1994). Cloning and sequencing of the *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A- RI apu gene and purification and characterization of the amylopullulanase from *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 94–101.
- Roohi, Kuddus, M., & Saima. (2013). Cold-active detergent-stable extracellular α -amylase from *Bacillus cereus* GA6: Biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation. *Jornal Biochem Tech*, 636–644.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 172.
- Rosenfeld, P. E. (2001). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 245–260.
- Roy, A., Messaoud, E. Ben, & Bejar, S. (2003). Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus* sp. US149. *Enzyme and Microbial Technology*, 720–724.
- Roy, I., & Gupta, M. N. (2004). Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 26–32.
- Rudiger, L., Jorgensen, P. L., & Antranikian, G. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after coning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 567–575.
- Saha, B. C., Lamed, R., Lee, C., Mathupala, S. P., & Zeikus, J. G. (1990). Characterization of an endo-acting amylopullulanase from *Thermoanaerobacter* Strain B6A. *Applied and Environmental Microbiology*, 881–886.
- Shaw, J. F., & Sheu, J. R. (1992). Production of high-maltose syrup and high-protein



- flour from rice by an enzymatic method. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1071–1073.
- Shen, G., Srivastava, K. C., Saha, B. C., & Zeikus, J. G. (1990). Physiological and enzymatic characterization of a novel pullulan-degrading thermophilic *Bacillus* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 340–344.
- Shingel, K. I. (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*, 447–460.
- Singh, R. K., Murty, H. R., Gupta, S. K., & Dikshit, A. K. (2009). An overview of sustainability assessment methodologies. *Ecological Indicators*, 189–212.
- Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515–531.
- Spreinat, A., & Antranikian, G. (1990). Purification and properties of a thermostable pullulanase from *Clostridium thermosulfuroenes* EM1 which hydrolyses both α -1,6 and α -1,4-glycosidic linkages. *Appl Microbiol Biotechnol*, 511–518.
- Sukumaran, J., & Hanefeld, U. (2005). Enantioselective C–C bond synthesis catalysed by enzymes. *Chemical Society Reviews*, 530.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I., & Hahm, Y. T. (2014). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Microbiology*, 93–103.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 195–201.
- Takasaki, Y. (1987). Pullulanase-amylase complex enzyme from *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 9–16.
- Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*, 137–155.

- Vieille, C., & Zeikus, J. G. (1996). Thermozyms identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Biotechnology Annual Review*, 183–190.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1–43.
- Vishnu, C., Naveena, B. J., Altaf, M., Venkateshwar, M., & Reddy, G. (2006). Amylopullulanase- a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 545–550.
- Yang, G., Yang, G., Aprile, L., Turturo, V., Pucciarelli, S., Pucciarelli, S., & Miceli, C. (2013). Characterization and comparative analysis of psychrophilic and mesophilic alpha-amylases from *Euplotes* species: A contribution to the understanding of enzyme thermal adaptation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 715–720.
- Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi, M., & Mollania, N. (2010). Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, maltotriose and starch to glucose and. *Enzyme and Microbial Technology* j, 57–63. maltose
- Zhang, H., Tian, Y., Bai, Y., Xu, X., & Jin, Z. (2013). Structure and properties of maize starch processed with a combination of α -amylase and pullulanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38–44.
- Zou, C., Duan, X., & Wu, J. (2016). Efficient extracellular expression of *Bacillus deramificans* pullulanase in *Brevibacillus choshinensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 495–504.

Abstract

Amylopullulanases (EC.3.2.1.41/1) hydrolyse starch and pullulan, catalyzing α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 6) linkages. Through homology search a near full-length putative *amylopullulanase* gene, *Amy1136*, from a thermophilic bacterium, *Cohnella* sp. A01, was amplified. The amplicon was cloned in pET-26b(+) and expressed in *E. coli* BL21. The recombinant enzyme was purified via incubation at 90 °C for 15 min followed by centrifugation. Heterologous expression of *Amy1136* was optimized via response surface methodology. The expression reached its maximum level at 26.7 °C, 179 rpm shake and 1.25. Biochemical and kinetic properties of the enzyme were analyzed on both starch and pullulan. The enzyme had the best activity at 50 °C (pH = 8). However, enzyme demonstrated a great stability at higher temperatures and a wide pH range. Amongst metal cations, Ag^+ improved enzyme activity by the order of many folds and the enzyme lost its activity in the presence of Co^{2+} . Interestingly, *Amy1136* was functioning independent of Ca^{2+} . Calculated K_m , V_{max} , turn over number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for the enzyme were 4.2 mg ml⁻¹, 650.38 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, 1129.38 s⁻¹, 269.09 s⁻¹ mg ml⁻¹ once pullulan was used as substrate, and 1.73 mg ml⁻¹, 337.59 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, 586.1 s⁻¹, 338.78 s⁻¹ mg ml⁻¹ in the presence of starch. Generally, the enzyme activity demonstrated a relatively sound activity in the presence of detergents and organic solvents. Thus by being a stable enzyme, *Amy1136* would be a great candidate for starch saccharification, baking, and detergent industries.

Keywords: Amylopullulanase, Cloning, Thermostable, Independent Ca^{2+} , *Cohnella* sp. A01



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Characterization of thermophilic Amylopullulanase isolated from
Cohnella sp. A01**

By: Faeze Hasani

Supervisors:
Dr. Naser Farrokhi
Dr. Saeed Aminzade

Advisor:
Dr. Mojtba Mamarabadi

September 2016

